



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Ocena właściwości antyproliferacyjnych kompleksów złota (III) z pochodnymi 2,2':6',2''-terpirydyny pod kątem ich potencjalnych zastosowań w terapii przeciwnowotworowej

Author: Marlena Golec

Citation style: Golec Marlena. (2019). Ocena właściwości antyproliferacyjnych kompleksów złota (III) z pochodnymi 2,2':6',2''-terpirydyny pod kątem ich potencjalnych zastosowań w terapii przeciwnowotworowej. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIwersytet Śląski w Katowicach
Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

Marlena Golec

„OCENA WŁAŚCIWOŚCI ANTYPROLIFERACYJNYCH
KOMPLEKSÓW ZŁOTA (III) Z POCHODNYMI
2,2':6',2''-TERPIRYDYNAMI POD KĄTEM ICH POTENCJALNYCH
ZASTOSOWAŃ W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ”

*Praca wykonana pod kierunkiem
prof. zw. dr hab. Alicji Ratusznej
oraz dr Agnieszki Szurko
w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego.*

Katowice 2019

Pani prof. zw. dr. hab. Alicji Ratusznej

*składam serdeczne podziękowania
za opiekę naukową, cenne wskazówki i okazaną życzliwość*

dr Agnieszce Szurko

*składam wyrazy wdzięczności
za przekazaną wiedzę, poświęcony czas,
pomoc i wsparcie podczas realizacji pracy*

Podziękowania dla zespołu Pani prof. zw. dr hab. Barbary Machury

*z Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego
za udostępnienie związków do badań,
co umożliwiło wykonanie niniejszej pracy*

Dziękuję współpracownikom

za wszelką pomoc i przyjazną atmosferę pracy

Mężowi

*dziękuję za wiarę we mnie.
wrozumiałość, cierpliwość i wsparcie*



PWP Partnerstwo - Informatyka - Nanofizyka - PIN

Autorka otrzymała stypendium w ramach projektu PWP Partnerstwo – Informatyka – Nanofizyka – PIN, współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY





Doktorantka odbyła trzymiesięczną praktykę w The Institute of Cancer Research
w Londynie w ramach programu Erasmus+.

LISTA PUBLIKACJI

1. M. Kądziołka-Gaweł and **M. Michałowska**, *⁵⁷Fe hyperfine parameters in vitamins and dietary supplements*, ACTA PHYSICA POLONICA A, 127(2), 653-655 (2015)
2. J. Peszke, A. Nowak, J. Szade, A. Szurko, D. Zygadło, **M. Michałowska**, P. Krzyściak, P. Zygoń, A. Ratuszna, M. M. Ostafin, *Effect of silver/copper nad copper oxide nanoparticle powder on growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria and their toxicity against the normal human dermal fibroblasts*, J Nanopart Res (2016) 18: 355
3. K. Czerwińska, **M. Golec**, M. Skonieczna, J. Palion-Gazda, D. Zygadło, A. Szlapa-Kula, S. Krompiec, B. Machura and A. Szurko, *Cytotoxic gold (III) complexes incorporating a 2,2':6',2''-terpyridine ligand framework – the impact of the substituent in the 4'-position of a terpy ring*, Dalton Trans. 2017, 46, 3381

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów i symboli.....	8
I. Cel pracy	10
II. Wprowadzenie	11
III. Część teoretyczna	12
1. Nowotwory	12
1.1. Cechy komórek nowotworowych	13
1.2. Epidemiologia nowotworów	13
1.3. Rak jelita grubego	18
1.4. Rak piersi	20
2. Terapie przeciwnowotworowe	22
2.1. Leki stosowane w chemioterapii	25
2.1.1. Dokсорubicyna	25
2.1.2. Cisplatyna	26
3. Kompleksy metali w terapiach przeciwnowotworowych	27
3.1. Kompleksy złota (III) z pochodnymi terpirydyny	28
4. Cykl komórkowy komórek zdrowych i nowotworowych.....	30
5. Mechanizmy śmierci komórkowej.....	34
IV. Część praktyczna	38
1. Badane związki oraz referencje	38
2. Badania fizyczne	40
2.1. Badania spektrofotometryczne.....	40
2.1.1. Widma absorpcyjne	40
2.1.1.1. Zależność absorpcji od pH roztworu	40
2.1.2. Widma emisyjne	41
3. Badania biologiczne.....	41
3.1. Linie komórkowe	41
3.2. Hodowla <i>in vitro</i>	42
3.3. Cytotoksyczność	43
3.3.1. MTS	43
3.3.2. Cell-Titer Glo®.....	44
3.4. Analiza cyklu komórkowego	45
3.5. Analiza reaktywnych form tlenu.....	47
3.6. Analiza apoptozy (test z Aneksyną V).....	47

3.7.	Analiza zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym (TMRE).....	48
3.8.	Analiza zmian masy mitochondrialnej (NAO)	48
3.9.	Analiza Western Blot.....	49
3.9.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych – izolacja białek.....	49
3.9.2.	Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych	49
3.9.3.	Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym.....	50
3.9.4.	Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową.....	50
3.9.5.	Inkubacja membrany z przeciwciałami.....	51
3.9.6.	Detekcja białek	51
3.10.	Lokalizacja związku w komórkach linii MCF7 za pomocą mikroskopii konfokalnej	52
3.11.	Analiza statystyczna	53
V.	Analiza i dyskusja wyników	54
1.	Badania spektrofotometryczne.....	54
1.1.	Widma absorpcyjne	54
1.1.	Zależność absorpcji od pH roztworu	58
1.2.	Widma emisyjne	59
2.	Cytotoksyczność	62
2.1.	MTS	62
2.2.	Cell-Titer Glo®.....	65
3.	Analiza cyklu komórkowego	68
4.	Analiza reaktywnych form tlenu na linii komórkowej HCT116	72
5.	Analiza apoptozy	74
6.	Analiza potencjału mitochondrialnego	76
7.	Analiza masy mitochondrialnej na linii komórkowej HCT116	76
8.	Analiza Western Blot.....	77
9.	Określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanych związków przy pomocy mikroskopii konfokalnej	80
VI.	Podsumowanie i wnioski	82
VII.	Literatura	84
VIII.	Spis tabel.....	93
IX.	Spis ilustracji.....	94
X.	Spis wykresów	95

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

A549 – linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka płuc

ATP – adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

Au14 – $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})](\text{PF}_6)_2$

Au5 – $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})]\text{PF}_6$

Bak – białko proapoptotyczne należące do rodziny białek Bcl-2 (ang. *Bcl-2 homologous antagonist killer*)

Bax – białko proapoptotyczne należące do rodziny białek Bcl-2 (ang. *Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 – produkt protoonkogenu Bcl-2, wykryty w białaczkach i chłoniakach, wywodzących się z limfocytów B; rodzina białek Bcl-2 (ang. *B-Cell Leukemia/lymphoma-2*)

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

CDKs – kinazy zależne od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*)

DAPI – dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*)

DMEM – podłoże hodowlane Dulbecco zmodyfikowane przez Eagle's (ang. *Dulbecco's modification of Eagle's medium*)

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DOX – doksorubicyna (ang. *doxorubicin*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EtOH – etanol (ang. *ethanol*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

HCT116 – linia komórek ludzkiego raka jelita grubego

HCT116p53^{-/-} - linia komórek ludzkiego raka jelita grubego z delecją genu p53

IC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia hamującego/stężenie związku, powodujące spadek odsetka żywych komórek w hodowli *in vitro* o 50% w porównaniu z kontrolą (ang. *half minimal inhibitory concentration*)

MCF7 – linia komórkowa ludzkiego estrogenozależnego gruczolakoraka piersi (ang. *adenocarcinoma estrogen-responsive*)

MeOH – metanol (ang. *methanol*)

MTS – sól błękitu tetrazolowego:3-(4,5-dimetylotiozol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol

NAO - N-nonyl oranż akrydyny (ang. *Nonyl Acridine Orange*)

p53 – białko kodowane przez gen supresorowy TP53 (ang. *tumor protein p53*)

PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *phosphate-buffered saline*)

PI – jodek propidyny (ang. *propidium iodide*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RTF – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, RTF)

SDS-PAGE – elektroforeza w warunkach denaturujących (ang. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*)

TMRE - ester etylowy tetrametylorodaminy (ang. *tetramethylrhodamine, ethyl ester*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

I. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej nowych kompleksów złota (III) z pochodnymi 2,2'':6',2''-terpirydyny. W zakres pracy wchodziło poznanie mechanizmu działania związków o najwyższej aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* oraz wyjaśnienie możliwego zastosowania potencjalnych leków w terapiach antynowotworowych.

II. Wprowadzenie

W ostatnich latach wciąż rośnie liczba osób zapadających na choroby nowotworowe. Jest to związane z wydłużaniem średniej długości życia, stylem życia, dietą, uprawianiem sportów oraz nałogami. Niestety często nowotwór jest wykrywany w stadium zaawansowanym, kiedy konieczne jest zastosowanie agresywnego leczenia. Współcześnie terapia chorób nowotworowych opiera się głównie na chemio- oraz radioterapii, a ich skuteczność zależy od rodzaju oraz stadium nowotworu. Chemioterapia jest leczeniem ogólnoustrojowym, nie pozostającym obojętnym dla organizmu chorego. Niesie ze sobą szereg skutków ubocznych, nie zawsze będąc skuteczną. Z tego powodu wciąż poszukuje się nowych, działających przeciwnowotworowo substancji, które charakteryzowałyby się większą skutecznością leczenia, z ograniczeniem skutków ubocznych i brakiem wpływu na komórki prawidłowe organizmu.

III. Część teoretyczna

1. Nowotwory

Normalnie komórki rosną i dzielą się by stworzyć nowe komórki potomne, wtedy kiedy organizm ich potrzebuje. W sytuacji, gdy komórki się starzeją, stają się uszkodzone, umierają – nowe komórki zajmują ich miejsce. W przypadku nowotworu te procesy zawodzą, komórki nowotworowe są w stanie ignorować sygnały, które komórkom normalnym nakazują zatrzymanie podziału komórkowego czy rozpoczęcia procesu programowanej śmierci komórkowej [1][2]. Wówczas komórki, które są nieprawidłowe i które powinny zostać skierowane na drogę śmierci komórkowej, przeżywają, formują się, mogą tworzyć guzy. Nowotwór jest zatem określeniem grupy komórek, które charakteryzują się nieprawidłowym i niekontrolowanym podziałem.

Nowotwór może rozwinąć się w dowolnej części ciała, a także rozprzestrzeniać się na inne jego części poprzez układ krwionośny i limfatyczny [1][2][3][4]. Większość nazw nowotworów pochodzi od narządów, w których się rozwinęły, np. rak piersi, rak jelita grubego [5]. Wśród nowotworów możemy wyróżnić nowotwory powstałe: z komórek nabłonka – raki, z gruczołów nabłonkowych – gruczolakoraki, z tkanki łącznej – mięsaki, z tkanki limfatycznej – chłoniaki, z komórek krwi – białaczki.

Nazwa „rak” używana jest do określenia nowotworu złośliwego, jednak nie każdy nowotwór złośliwy jest rakiem [6]. Nowotwory mogą być łagodne lub złośliwe. Pierwsza grupa nowotworów rośnie powoli, nie nacieka na okalające guz tkanki, nie daje przerzutów. Z kolei druga grupa nowotworów cechuje się tym, że nacieka na okalające tkanki, często daje przerzuty i szybko rośnie [2][6].

Wyłonienie się zmutowanej komórki jest pierwszym etapem procesu nowotworzenia, nazywanym inicjacją. Rozróżnia się trzy grupy genów, których mutacje mogą powodować rozwój nowotworu: protoonkogeny, geny supresorowe (zatrzymujące transformację nowotworową) oraz geny mutatorowe (mutacje w tych genach podwyższają częstość mutacji w genomie) [7].

1.1. Cechy komórek nowotworowych

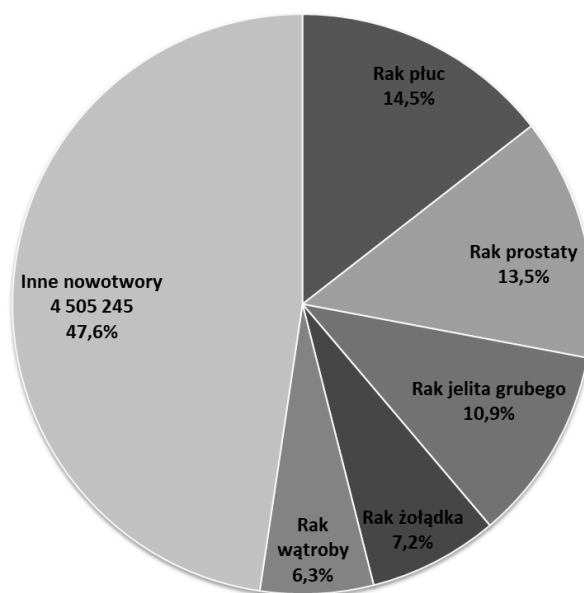
Komórki nowotworowe charakteryzują się szeregiem cech różniących je od normalnych komórek organizmu [2][8][9]. Hanahan i Weinberg [9] wyodrębniają cechy komórek nowotworowych, dzięki którym stają się one niezależnymi komórkami organizmu, niepodlegającymi regulacjom, są to: wytwarzanie czynników wzrostu, brak wrażliwości na zewnętrzne inhibitory wzrostu, odporność na czynniki wywołujące apoptozę, nieograniczony potencjał replikacyjny – czyli nieśmiertelność. Druga grupa właściwości komórek nowotworowych to cechy, pozwalające na komunikację z komórkami prawidłowymi organizmu i są to: zdolność do formowania naczyń krwionośnych i limfatycznych, możliwość tworzenia odległych przerzutów, agresywny wzrost oraz potencjał do „ukrycia się” przed układem odpornościowym [8][9].

1.2. Epidemiologia nowotworów

Wg The Global Cancer Observatory w 2018 roku zostało zdiagnozowanych ponad 18 mln (rys. 1) nowych zachorowań na nowotwory, odnotowano także ponad 9,5 mln zgonów z powodu tych chorób [10]. Największy procent zachorowań wśród mężczyzn to nowotwory płuc (14.5%, 1 368 524 zachorowań), prostaty (13.5%, 1 276 106 zachorowań), jelita grubego (10.9%, 1 026 215 przypadków). Wśród kobiet najwięcej zachorowań dotyczy raka piersi (24.5% wszystkich przypadków, 2 088 849 zachorowań), raka jelita grubego (9.5%, 823 303 zachorowania) oraz płuca (8.4%, 725 352 przypadki) [10].

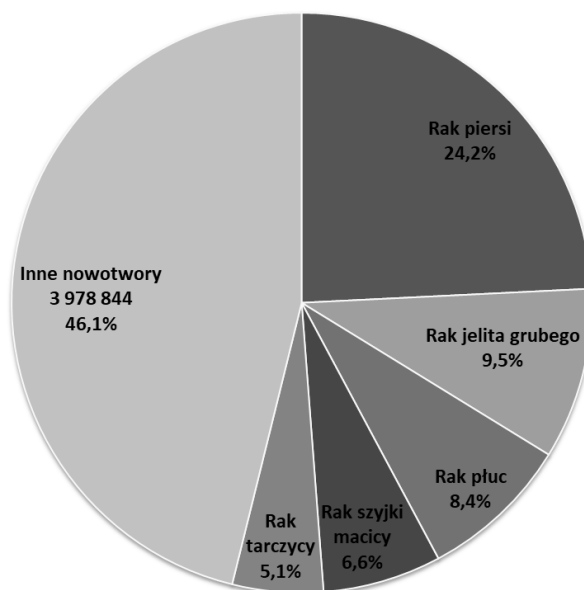
Podobnie statystyki rozkładają się w przełożeniu na Europę. Na rys. 2 przedstawione są dane za rok 2018. Zdiagnozowanych zostało około 4 200 000 nowych przypadków zachorowań oraz odnotowano prawie 2 mln przypadków śmierci z powodu nowotworów. W krajach europejskich najczęściej dotykającym mężczyzn nowotworem jest rak prostaty (20%, 449 761 przypadków), dopiero na drugim miejscu znajduje się nowotwór płuc (13.9%, 311 843 przypadki), trzecie miejsce podobnie jak w statystykach światowych zajmuje rak jelita grubego (12.1%, 271 600 przypadków). Dla kobiet z kolei statystyki są bardziej zbliżone do statystyk światowych – kobiety najczęściej chorują na raka piersi (26.4%, 522 513 przypadków), raka jelita grubego (11.5%, 228 067 przypadków) oraz płuc (8%, 158 196 przypadków) [11].

Liczba nowych przypadków zachorowań wśród mężczyzn w 2018 roku



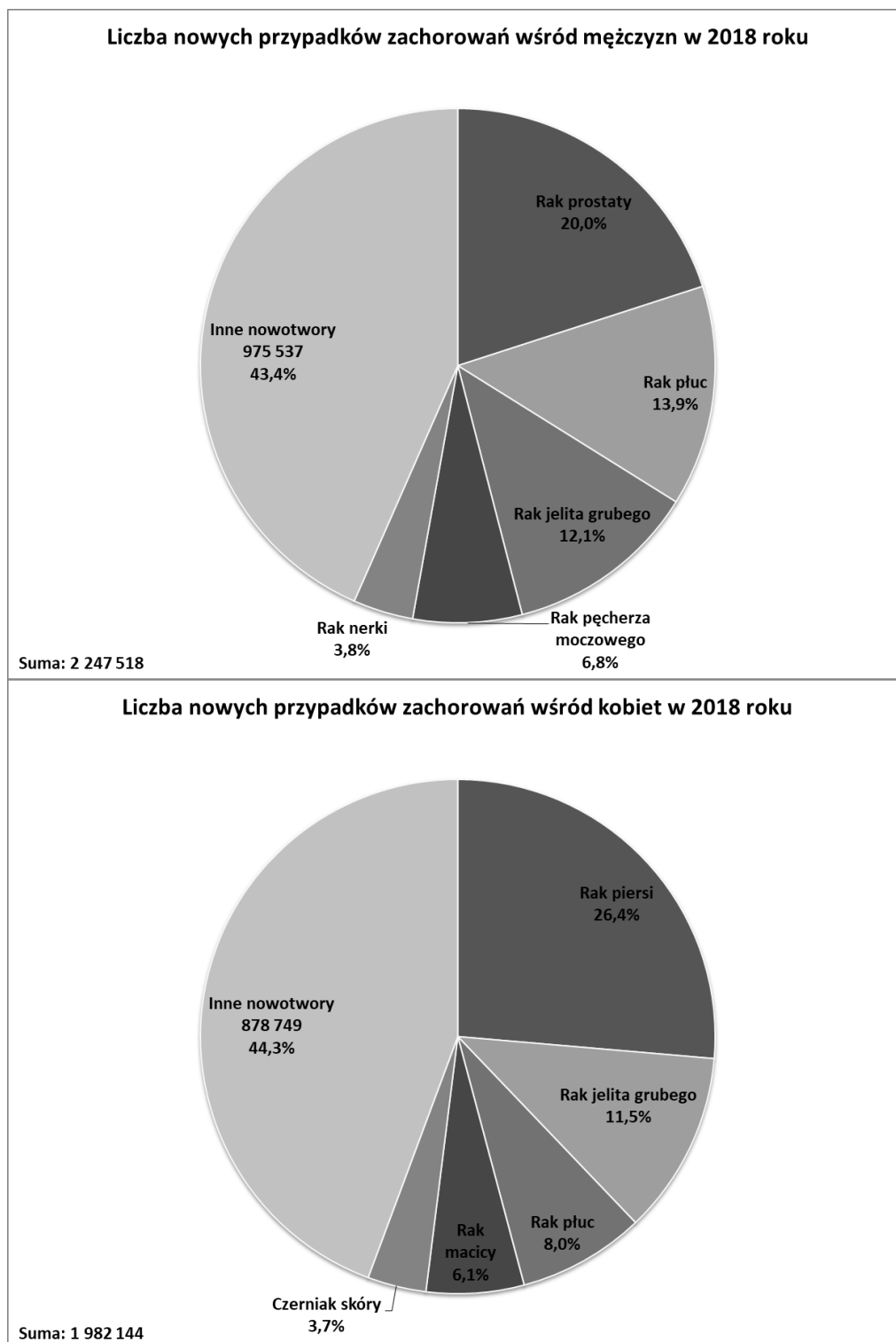
Suma: 9 456 418

Liczba nowych przypadków zachorowań wśród kobiet w 2018 roku



Suma: 8 622 539

Rysunek 1. Statystyki zachorowań na nowotwory w 2018 roku na świecie [10]

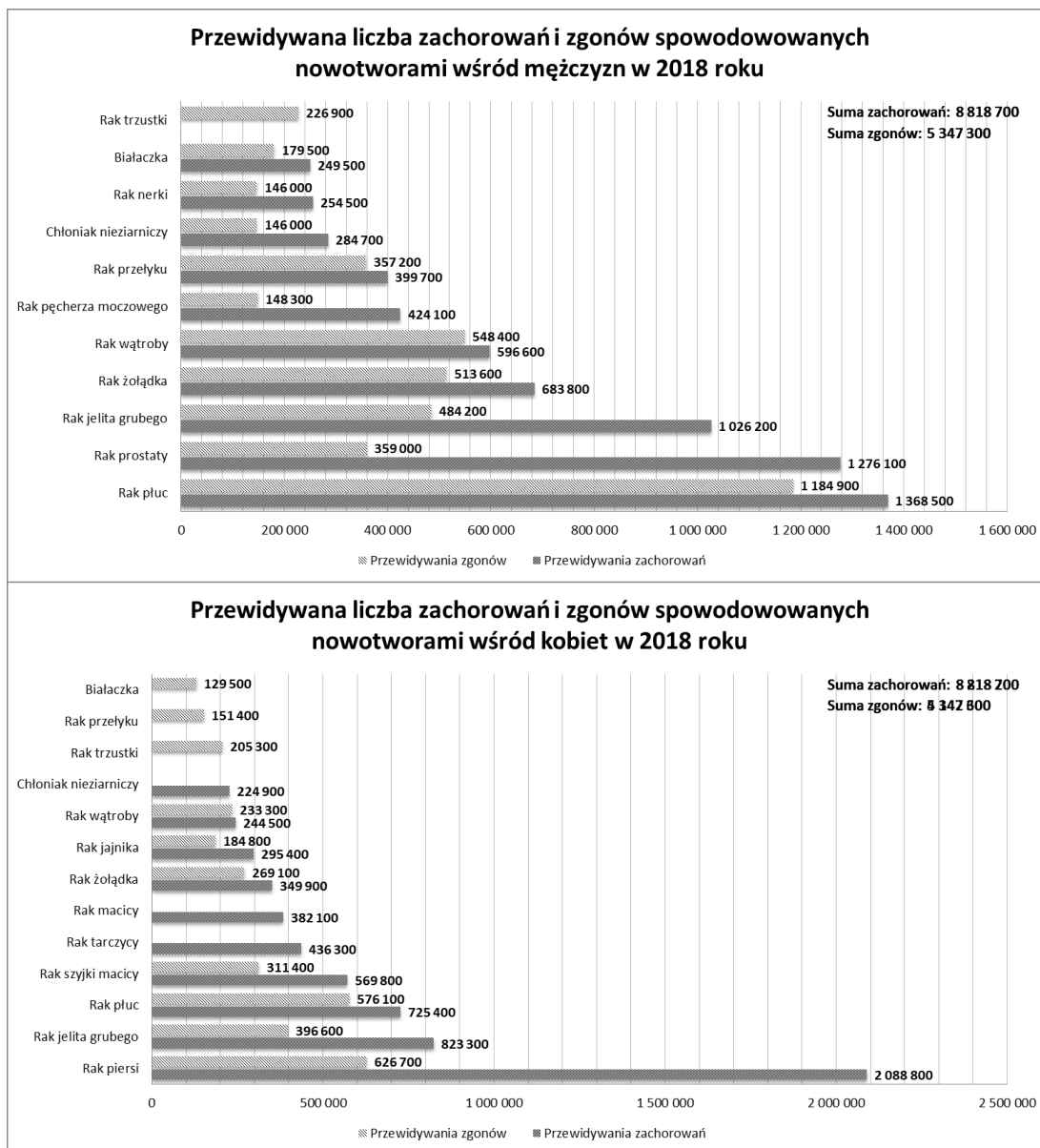


Rysunek 2. Statystyki zachorowań na nowotwory w 2018 roku w Europie [11]

Zbieżne do już przedstawionych statystyk przedstawia American Cancer Society (rys. 3). Według szacunków tego stowarzyszenia na świecie w 2018 roku spodziewanych było ponad 8,8 mln zachorowań na raka wśród mężczyzn i ponad 8,2 mln wśród kobiet. Najpopularniejszymi nowotworami wśród tych grup są: dla

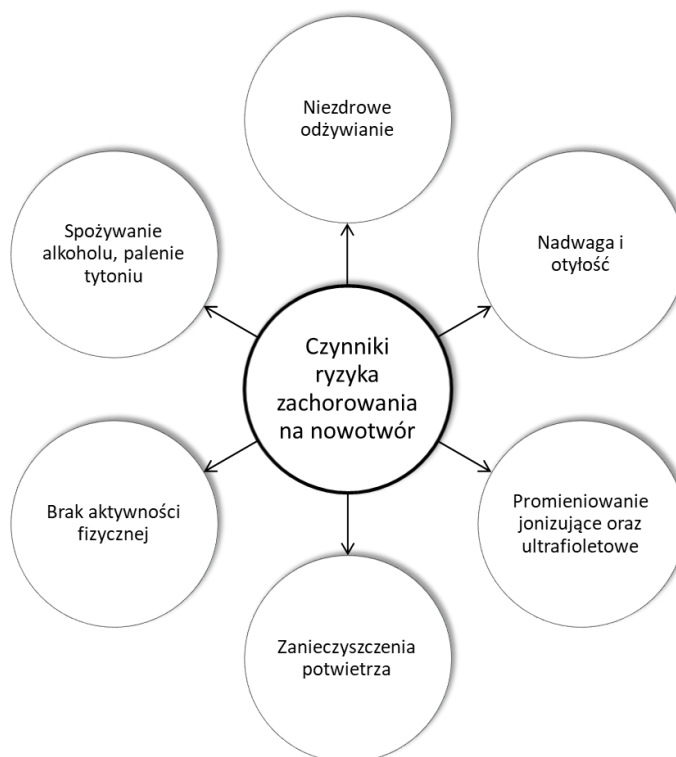
mężczyzn – rak płuc (1,3 mln), prostaty (1,2mln) oraz jelita grubego (1mln). U kobiet z kolei najczęściej diagnozowanym nowotworem jest rak piersi (2,2 mln zachorowań), jelita grubego (820 tys.), a także nowotwór płuca (700 tys.) [12].

Czynniki rakotwórcze mogą być obecne w powietrzu, wodzie, jedzeniu, środkach chemicznych, itp. [5] Jednak czynniki środowiskowe nie są jedynymi,



Rysunek 3. Przewidywana liczba zachorowań i śmierci z powodu nowotworów na świecie w 2018 roku [12]

które związane są z występowaniem nowotworów. Trudno zweryfikować kto w najbliższym otoczeniu może zachorować na nowotwór, a kto z 100% pewnością nie. Jednakże dotychczasowo przeprowadzone badania pomimo tego, że nie potrafią określić dokładnie możliwości zachorowania na nowotwór, określają pewne czynniki ryzyka, które mogą zwiększyć możliwość zachorowania (bądź ją zmniejszyć) [13].



Rysunek 4. Czynniki zachorowania na nowotwór [14]

Na rys. 4 przedstawione zostały główne czynniki ryzyka dla wystąpienia nowotworu wg WHO (ang. *World Health Organization*/Światowa Organizacja Zdrowia) [14]. Dotyczy to nowotworów ogółem (w przypadku poszczególnych typów mogą występować dodatkowe czynniki ryzyka) są to: palenie tytoniu, nadmierne spożywanie alkoholu, otyłość, brak aktywności fizycznej oraz niezdrowy sposób odżywiania (z niskim spożyciem warzyw i owoców), wirusowe czynniki rakotwórcze (tj. HPV, HBV), wysoka ekspozycja na promieniowanie jonizujące oraz ultrafioletowe, a także zanieczyszczenia powietrza. WHO szacuje, że około 30-50% nowotworów można zapobiec poprzez unikanie czynników ryzyka i wdrażając działania profilaktyczne. Ryzyko można również zmniejszyć wczesnym wykryciem choroby i rozpoczęciem leczenia. Wiele nowotworów ma

wysoką szansę na wyleczenie, jeśli zostanie ono wprowadzone odpowiednio wcześniej [14].

1.3. Rak jelita grubego

Rak jelita grubego jest trzeci pod względem częstości występowania na świecie [10][11][12][15] i czwarty pod względem śmiertelności [15]. Wzrost zachorowań obserwowany jest wraz z wiekiem. Mediana wieku dla wykrycia raka jelita grubego wynosi 70 lat w krajach rozwiniętych. Największa zapadalność na tą chorobę jest w Europie, Północnej Ameryce oraz Oceanii, najmniejsza z kolei w południowej i centralnej Azji i Afryce. Szybki wzrost zachorowań obserwowany w krajach o początkowo niskim wskaźniku zachorowań (kraje takie jak np. Hiszpania) wiązany jest z wzorcami dietetycznymi i czynnikami ryzyka nazywanymi zachodnim stylem życia. Dla nowotworu raka jelita grubego nie można jednoznacznie określić czynników ryzyka. Poza wiekiem oraz płcią (większość zachorowań dotyczy mężczyzn) [10][12][15] zidentyfikowano jeszcze: historię zachorowań na raka jelita grubego w rodzinie, nieswoiste zapalenia jelit, palenie papierosów, nadmierne spożywanie alkoholu, wysokie spożywanie czerwonego i przetworzonego mięsa, otyłość oraz cukrzyca [15].

W zachorowaniu na raka jelita grubego występują też czynniki genetyczne:

- mutacja genu APC (ang. adenomatous polyposis coli), objawiająca się zaburzeniem rozmnażania się kolonocytów, co prowadzi do niekontrolowanego wzrostu [16]
- mutacja genu p53, odpowiedzialnego między innymi za wykrywanie uszkodzeń DNA i kierowanie komórki na drogę apoptozy. Mutacja powoduje zaburzenie tej funkcji i prowadzi do rozwoju nowotworu [16]
- mutacja genu K-ras (występuje u 30-50% chorych z polipami i nowotworami jelita grubego), prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek [16]
- mutacja genów hMSH2, hMLH1 i hPMS1, upośledzająca prawidłowe rozmnażanie komórek [16]

- mutacja genu DCC (ang. *deleted in colorectal carcinoma*), występująca u 70-85% chorych [16].

Rakiem jelita grubego nazywany jest nowotwór, który rośnie w okrężnicy, bądź odbytnicy. Nowotwory te mogą być nazywane również nazwą narządu, w którym się rozwijają, jednakże najczęściej są nazywane ogólnie rakiem jelita grubego, ponieważ posiadają wiele cech wspólnych [17]. Większość nowotworów jelita grubego charakteryzuje się obecnością polipów w okrężnicy lub odbytnicy. Nie każdy polip jest zmianą nowotworową, ale w zależności od jego rodzaju może on zmienić się w nowotwór. Jeśli rak występuje w formie polipów, może on z biegiem czasu wrosnąć w ścianę okrężnicy lub odbytnicy. Jeśli tak się stanie, komórki nowotworowe mogą przedostać się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych i stworzyć przerzut w oddalonej od jelita grubego części ciała. Stopień nowotworu oraz szybkość jego rozprzestrzenienia się w organizmie zależy od tego, jak głęboko wrósł on w ścianę jelita grubego [17].

Najczęściej występującym nowotworem jelita grubego (96%) jest rak gruczołowy. Komórki nowotworowe rozwijają się z komórek produkujących śluz wyściełający okrężnicę i odbytnicę. Innymi, rzadziej występującymi typami raka jelita grubego są: rakowiaki (rozwijające się z komórek wytwarzających hormony w jelicie), nowotwory podścieliskowe układu pokarmowego (rozwijające się z komórek Cajala (wyspecjalizowane komórki mięśniowe układu pokarmowego)), chłoniaki (rozwijające się z komórek układu limfatycznego), mięsaki (rozwijające się w naczyniach krwionośnych, mięśniach lub innych tkankach łącznych występujących na ścianach okrężnicy lub odbytnicy) [17].

Diagnoza jest wydawana na podstawie badania histopatologicznego próbki pobranej podczas endoskopii. Leczenie w zależności od stopnia zaawansowania guza obejmuje operację chirurgiczną i/lub terapię neoadjuwantową [15], terapię celowaną, immunoterapię, chemioterapię [17]. Wybór odpowiedniej formy leczenia zależy od kilku czynników: interakcji leków, stopnia histologicznego zróżnicowania guza, wieku oraz płci pacjenta, a także stopnia zaawansowania choroby [18]. Ważną rolę w leczeniu odgrywa polimorfizm genetyczny. Najważniejsze występujące polimorfizmy to: polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*), polimorfizm

delacja/insercja (D/I) oraz polimorfizm zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR, ang. *variable numer of tandem repeats*) [18]. Najczęściej stosowanymi chemioterapeutykami w terapii są: Fluorouracyl, Kapecytabina, Irynotekan, Oksaliplatyna (pochodna platyny), Triflurydyna i Tipiracyl [19]. Oksaliplatyna jest pochodną cisplatyny. Jej mechanizm działania polega na tworzeniu adduktów z DNA, co zaburza proces replikacji komórek. Wpływ na efektywność leczenia oksaliplatyną ma rodzina genów ERCC (ang. *excision repair cross-complementing gene family*) oraz aktywność transferazy S-glutationowej (GSTP1) [18]. Geny ERCC są elementem mechanizmu NER (ang. *nucleotide excision repair*) - mechanizmu naprawy DNA w komórkach nowotworowych. Kluczowym członkiem rodziny genów ERCC jest gen ERCC1, który koduje białko biorące udział w systemie naprawy NER. Dowiedziono, że niski poziom ekspresji tego genu związany jest z dłuższym czasem przeżycia pacjentów, leczonych oksaliplatyną, którzy chorują na zaawansowany nowotwór [18]. Podobnie jak zmniejszenie ekspresji transferazy S-glutationowej (GSTP1) skutkuje podwyższeniem skuteczności leczenia oksaliplatyną [18].

1.4. Rak piersi

Rak piersi jest złożoną chorobą ze względu klinicznego, morfologicznego i molekularnego. Klinicyści są coraz bliżej oferowania spersonalizowanego leczenia, jednak nadal pozostaje wiele niewyjaśnionych kwestii istniejących terapii. Występuje silna potrzeba identyfikacji i walidacji nowych molekularnych markerów, szczególnie w przypadkach, w których brak jasnego targetu terapeutycznego [20].

Rakiem piersi nazywamy chorobę, w której komórki w piersi zaczynają niekontrolowanie się mnożyć. Takie komórki zwykle formują się w guza, który jest możliwy do uwidocznienia na prześwietleniu, bądź wyczuwalny w badaniu palpacyjnym. Większość nowotworów tego typu rozpoczyna się w kanalikach mlecznych (rak przewodowy), ale mogą również rozwinąć się z tkanek gruczołowych (rak zrazikowy). Te dwa rodzaje nowotworów są najczęściej spotykane. Wiele zmian w piersi można zobaczyć podczas mammografii we wczesnym stadium rozwoju, jeszcze przed tym, gdy będą wyczuwalne i dające symptomy [20][21]. Rak piersi rozprzestrzenia się, gdy komórki nowotworowe

dostaną się do układu krwionośnego lub limfatycznego [20]. Nowotwór piersi jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet wg American Cancer Society [12][22] oraz The Global Cancer Observatory [10][11] i jednym z najbardziej śmiertelnych [12][22].

Rak piersi jest nowotworem hormonozależnym. Estrogeny poprzez dyfuzję dostają się do wnętrza komórki, gdzie łączą się z receptorem estrogenowym. Wówczas konformacja receptora się zmienia, pozwalając na łączenie się z sekwencjami DNA (elementy odpowiedzi na estrogen - EREs, ang. *Estrogen Response Elements*). Wiązanie estrogenu z receptorem, wywołuje syntezę receptora progesteronowego. Wynika z tego, że aktywność receptora progesteronowego jest uwarunkowana obecnością i prawidłowym działaniem receptora estrogenowego [23]. Poziom ekspresji obu receptorów zależny jest od stopnia zaawansowania nowotworu, Na podstawie występowania lub jego braku receptorów można wyróżnić 4 fenotypy raka piersi: rak ER+/PR+/, rak ER+/PR-/, rak ER-/PR+/ i rak ER-/PR-/. W zależności od rodzaju nowotworu dobierane jest odpowiednie leczenie. W rakach ER+/PR+/ - im wyższa zawartość hormonów, tym lepsza odpowiedź na leczenie hormonalne [23].

Wczesne wykrycie nowotworu zwiększa szansę na wyleczenie, dlatego bardzo ważna jest profilaktyka, samobadanie piersi i regularne wykonywanie mammografii. Najczęstszym objawem raka piersi jest guz. Bezbolesna, twarda masa o nieregularnym kształcie to najczęściej spotykany guz, jednakże rak piersi może być również delikatny, miękki bądź okrągły. Może być nawet bolesny. Z tych powodów bardzo ważne jest aby każdą zmianę w piersiach zbadać u specjalisty. Inne spotykane symptomy raka piersi to:

- Obrzęk całej piersi lub jej części (nawet jeśli nie wyczuwa się wyraźnego guzka)
- Podrażnienie skóry lub wgłębienie (czasem przypominające skórę pomarańczową)
- Ból piersi lub brodawki sutkowej
- Wciąganie brodawki (obracanie się do wewnątrz)
- Zaczerwienienie, łuszczenie się lub pogrubienie sutka lub skóry piersi
- Wyciek z sutków (inny niż mleko) [22].

W leczeniu tego typu nowotworu stosowane są różne metody: chemioterapia, operacja chirurgiczna, terapia hormonalna, terapia celowana [22].

Najpowszechniej używanymi chemioterapeutykami w leczeniu raka piersi są: antracykliny (Doksorubicyna, Epirubicyna), taksany (Paklitaksel, Docetaksel), leki platynowe (Cisplatyna, Karboplatyna) [24].

Jak już wspomniano wcześniej podjęcie odpowiednio wcześniej prawidłowego leczenia znacznie zwiększa szansę chorego na wyzdrowienie. Z tego powodu poszukiwane są markery nowotworu piersi. Takie wyznaczniki mogą być diagnostyczne, prognostyczne lub diagnostyczno-prognostyczne. Te pierwsze pozwolą określić prawdopodobieństwo wystąpienia choroby, natomiast te drugie dają informację na temat przebiegu leczenia raka [7]. Czynniki prognostycznymi raka piersi są: wielkość guza, stopień złośliwości, stan pachowych węzłów chłonnych, występowanie przerzutów. Czynniki predykcyjno-prognostycznymi raka piersi są ekspresje receptorów: estrogenowego alfa (ER α), progesteronowego (PR), a także receptora naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2) [7].

Najpowszechniej spotykanymi mutacjami w raku piersi są mutacje protoonkogenów: *c-myc*, *int-2*, *CCND1* (*cyklina D1*), *HER-2* (*ERBB2*), a także mutacje genów supresorowych: *p53*, *BCRA1*, *BCRA2*, *CHEK2*, *Rb1*, *PTEN*, *ATM* oraz *CDH1* (*E-kadheryna*) [7].

2. Terapie przeciwnowotworowe

Leczenie systemowe nowotworów polega na podaniu leków ogólnoustrojowo, w przeciwieństwie do leczenia miejscowego, jakim jest chirurgia i radioterapia.

Wyróżniamy kilka metod leczenia systemowego:

- chemioterapia – leczenie z użyciem leków (cytostatyki) doprowadzających do zlikwidowania ognisk nowotworowych, spowolnienia rozrostu guza lub jego zatrzymania, złagodzenia objawów w leczeniu paliatywnym; oddziałuje na cały organizm, wiąże się z występowaniem skutków ubocznych; lek dobierany jest na podstawie kilku parametrów: typu nowotworu,

jego stadium, wieku pacjenta, stanu zdrowia pacjenta, innych chorób pacjenta, wcześniej stosowanego leczenia, itp. [25]

- terapia celowana jest to rodzaj chemioterapii, w którym stosowane są leki działające na konkretny receptor umiejscowiony na komórce nowotworowej lub blokujący przekazywanie informacji wewnątrz komórki (hamowanie szlaków molekularnych ontogenezy) [26]. Do najczęściej stosowanych leków tej grupy należą przeciwciała monoklonalne oraz inhibitory kinazy tyrozynowej.

- immunoterapia – terapia, w której w leczeniu nowotworu używany jest system immunologiczny pacjenta. Może być wykonana na dwa sposoby: poprzez stymulację własnego układu odpornościowego pacjenta do rozpoznawania i zwalczania komórek nowotworowych lub poprzez podanie pacjentowi specjalnie stworzonych immunoprotein [27].

- hormonoterapia - leczenie systemowe z wykorzystaniem leków hormonalnie czynnych.

Natomiast leczenie miejscowe sprowadza się do:

- chirurgii – usunięcie guza nowotworowego wraz z okalającymi tkankami podczas operacji chirurgicznej [14]

- radioterapii – zastosowanie promieniowania jonizującego w celu zmniejszenia guza nowotworowego, wyleczenia, ochrony przed wznową oraz leczenia symptomów w przerzutowaniu nowotworu [28]. W radioterapii wykorzystuje się wysoko energetyczne cząsteczki bądź fale, takie jak: promieniowanie Rentgenowskie, promieniowanie gamma, wiązki elektronowe, protonowe w celu zniszczenia lub uszkodzenia komórek nowotworowych [25]. Promieniowanie powoduje pęknięcia w nici DNA komórek, co powstrzymuje komórki przed dalszym wzrostem i rozmnażaniem [28].

Celem leczenia nowotworów za pomocą chemioterapii jest są 3 główne założenia:

- leczenie – pozbycie się komórek nowotworowych z organizmu
- kontrola – jeśli leczenie nie jest możliwe, celem jest kontrola choroby, a więc zmniejszenie guza, zatrzymanie rozrostu

- uśmierzenie bólu – jeśli guz jest w stadium zaawansowanym, chemioterapia czasem stosowana jest w celu opieki paliatywnej oraz polepszenia komfortu życia osobie chorej [29].

W przeciwieństwie do leczenia chirurgicznego, bądź przy zastosowaniu radioterapii, gdzie usuwane i niszczone są komórki w obszarze guza nowotworowego, chemioterapia oddziałuje na cały organizm. Leki stosowane w chemioterapii mają za zadanie zlikwidowanie w organizmie komórek nowotworowych, które podlegają szybkim podziałom. Niestety w organizmie ludzkim występują także inne grupy komórek szybko dzielących się. Poza tym, także dożylny sposób podania leku sprawia, że działanie chemioterapeutyków jest ogólnoustrojowe, co powoduje występowanie szeregu działań niepożądanych [25]. Do najczęściej występujących zaliczamy:

- problemy ze spożywaniem posiłków – zmiany apetytu
- zmęczenie, osłabienie
- utrata włosów (komórki szybko dzielące się - cebulki włosowe)
- częste infekcje (zmniejszenie ilości komórek układu odpornościowego (komórki szybko dzielące się))
- niski poziom krwinek (niewydolność szpiku kostnego (komórki szybko dzielące się))
- nudności i wymioty (błona śluzowa przewodu pokarmowego (komórki szybko dzielące się))
- ból
- neuropatia obwodowa – uszkodzenie nerwów obwodowych na dłoniach i stopach
- uszkodzenia mięśnia sercowego (kardiotoksyczność) [25].

2.1. Leki stosowane w chemioterapii

Obecnie stosowanych w leczeniu nowotworów za pomocą chemioterapii stosowanych jest około 100 różnych substancji chemicznych. Chemioterapeutyki możemy podzielić na kilka grup związków:

- leki alkilujące, które oddziałują z DNA, działają w każdej fazie cyklu komórkowego, wykorzystywane w leczeniu wielu typów nowotworów, np. cisplatyna, karboplatyna [25]

- antymetabolity – interferują z DNA i RNA, zastępując nukleotydy, działają podczas fazy cyklu, w której kopiowane są chromosomy, zwykle stosowane w leczeniu białaczek, np. 5-fluorouracil [25]

- antracykliny są antynowotworowymi antybiotykami, które interferują z enzymami związanymi z kopiowaniem łańcucha DNA podczas cyklu komórkowego, powodując zmiany w DNA komórek nowotworowych, prowadząc do zatrzymania ich wzrostu i powielania, stosowane w wielu odmianach nowotworów, np. dokсорubicyna [25]

- inhibitory topoizomeras – związki interferujące z topoizomerasami, które pomagają odseparować nici DNA, tak aby mogły zostać skopiiowane, stosowane w leczeniu niektórych typów białaczki, jak i również innych typów nowotworów, np. topotecan, teniposide [25]

- inhibitory mitozy – ich działanie polega na zatrzymaniu dzielenia się komórek, uszkadzają komórki w każdej fazie cyklu komórkowego, np.: paklitaksel, docetaksel [25].

2.1.1. Dokсорubicyna

Dokсорubicyna jest chemioterapeutykiem najczęściej stosowanym w leczeniu takich nowotworów, jak: rak piersi, rak jajnika, rak płuc, neuroblasoma i białaczka. Efektywność leku w leczeniu nowotworu piersi jest zależna od stopnia złośliwości histologicznej guza [4]. Dokсорubicyna należy do antybiotyków z grupy antracyklin o działaniu cytostatycznym, czyli blokującym cykl komórkowy, wyzwalającym w komórkach mechanizmy śmierci komórkowej. Działanie tego chemioterapeutyku polega na interkalowaniu z DNA,

a więc wbudowywaniu się w strukturę DNA, hamując możliwość replikacji [4][30][31][32]. Inny mechanizm działania doksorubicyny jest związany z hamowaniem topoizomerazy II, zakłócając powstawanie kompleksu topoizomerazy z DNA, co prowadzi do podwójnonicowych pęknięć łańcucha DNA [30][33]. Jednakże kliniczne stosowanie antracyklin z czasem powoduje odporność komórek nowotworowych na leczenie tym środkiem [4][33][34][35], a także powoduje wysoką toksyczność systemową dla zdrowych komórek [33][36][37]. Innym mechanizmem działania doksorubicyny jest również produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) [33].

Doksorubicyna może być stosowana w połączeniu z innymi chemioterapeutykami. Jest podawana dożylnie w cyklach ustalonych przez lekarza onkologa. Skutki uboczne przyjmowania doksorubicyny: zwiększone ryzyko infekcji (chemioterapia zmniejsza poziom białych krwinek, które pomagają zwalczać infekcje organizmu), mdłości i wymioty (mogą się pojawić kilka godzin po przyjęciu leku i trwać przez kilka dni), osłabienie, utrata włosów na całym ciele, ból gardła, czerwony/różowy kolor moczu, utrata apetytu, biegunka, podwyższona temperatura ciała, obrzęk i ból dłoni i stóp, zmiany w wątrobie (ustępujące po zakończeniu leczenia) [30].

2.1.2. Cisplatyna

Cisplatyna jest jednym z pierwszych kompleksów metali o własnościach antynowotworowych odkryta w latach 60. XX wieku [38]. Jest kompleksem platyny (II), na który składają się dwa atomy chloru i dwie cząsteczki amoniaku rozmieszczone w konfiguracji cis [39].

Cisplatyna oraz jej pochodne drugiej generacji (tj. karboplatyna lub oksaliplatyna) są chemioterapeutykami najszerzej stosowanymi w różnych typach nowotworów, np. nowotwory pęcherza moczowego, głowy i szyi, płuc, jajnika, jąder [39][40][41][42][43][44]. Jej aktywność przeciwnowotworowa polega na wiązaniu się z DNA: blokuje mechanizmy naprawy DNA, uszkadza DNA, indukuje apoptozę komórki nowotworowej [45]. A także tworzy rodniki ponadtlenkowe [40]. Ze względu na odporność komórek nowotworowych oraz rozległość skutków ubocznych stosowania cisplatyny (neurotoksyczność, toksyczność obejmująca układ pokarmowy, ototoksyczność [40][45], reakcje

alergiczne, zmniejszenie odporności [45][46]), poszukuje się leków o podobnych właściwościach terapeutycznych z mniejszą toksycznością ogólnoustrojową.

Poza faktem, że cisplatyna jest wydajna w leczeniu kilku rodzajów nowotworów, jej efektywność jest ograniczona efektami ubocznymi oraz opornością w leczeniu przerzutów [38].

Niestety leki platynowe nie mają zastosowania we wszystkich typach nowotworów. Ponadto występuje również rezystywność. Te wady spowodowały wzrost zainteresowania poszukiwaniem potencjalnych leków wśród innych kompleksów metali [42].

3. Kompleksy metali w terapiach przeciwnowotworowych

Odkrycie cisplatyny oraz karboplatyny miało ogromny wpływ na rozwój chemioterapii [42]. Jednakże liczba nowotworów, które można leczyć tymi lekami oraz efektywność tych terapii jest ograniczona poprzez efekty uboczne oraz oporność lekową. Te problemy skłoniły naukowców, do poszukiwania innych kompleksów metali, które można by było wykorzystać, jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Kompleksy z centralnym atomem metalu, takie jak: żelazo, kobalt czy też złoto wykazały obiecujące rezultaty w badaniach przedklinicznych. Z kolei kompleksy z centralnymi atomami: tytanu, rutenu czy galu przeszły do I lub II fazy w badaniach klinicznych. Prawie wszystkie stosowane dotychczas leki przeciwnowotworowe są związkami nie zawierającymi metali. Jednakże zainteresowanie takimi kompleksami rośnie ze względu na ich właściwości kinetyczne i mechanizm działania odmienny od związków organicznych. Liczne kompleksy metali zostały przebadane *in vitro* oraz *in vivo* pod kątem użycia ich w terapiach przeciwnowotworowych [42]. W związku z podniesionymi argumentami dużą uwagę w ostatnich latach skupiły na sobie związki złota jako potencjalne leki przeciwnowotworowe [39][47][48][49][50][51].

Sole ferrocenu były pierwszymi kompleksami żelaza, dla których wykazano aktywność przeciwnowotworową. Sam ferrocen jest nieaktywny oraz nierozpuszczalny w wodzie. Odpowiednio podstawiony ferrocen może interkonwertować wewnątrz komórki nowotworowej pomiędzy stanem utlenienia

+II (ferrocen) i stanem utlenienia +III (jony ferrocenu). Wykazano, że cytotoksyczność soli ferrocenu nie jest związana bezpośrednio z DNA, tylko z zdolnością do formowania reaktywnych form tlenu prowadząc do uszkodzeń oksydacyjnych DNA [42].

Kompleksy alkinowe kobaltu pierwszy raz zostały zastosowane przeciwko komórkom mysiej białaczki. Następnie, w 1997 roku zostały zaprezentowane badania, w których właściwości antyproliferacyjne kompleksów kobaltu ujawniono na ludzkich liniach nowotworowych, najbardziej zauważalny efekt był na komórkach raka piersi [42].

3.1. Kompleksy złota (III) z pochodnymi terpirydyny

Kompleksy złota (I) są z użyciu w medycynie od przeszło 30 lat [39][52][53]. Auranofina jest doustnie podawanym fosfonowym kompleksem złota (I) używanym w reumatoidalnym zapaleniu stawów [42]. Doniesienia z lat 70-tych i 80-tych ubiegłego wieku wskazywały na aktywność zatrzymującą wzrost komórek nowotworowych *in vitro*. Auranofina zatrzymuje syntezę DNA, RNA oraz białek w stężeniach cytotoksycznych, ale w porównaniu z innymi kompleksami złota nie oddziałuje bezpośrednio z DNA. Aktywność cytotoksyczna jest dawko-, czaso- oraz temperaturozależna [42]. Dopiero w ostatnich latach uwaga badaczy skupiła się na użyciu kompleksów złota (I lub III) w leczeniu nowotworów [39][53][54][55][56][57]. Odkrycie antynowotworowych właściwości cisplatyny w 1965 roku poskutkowało wzrostem zainteresowania naukowców w poszukiwaniu innych kompleksów metali, które miałyby podobne własności. Podobieństwo Au (III) i Pt (II) pod względem izoelektrycznym i izostrukтурalnym, a także kwadratowa geometria obu pierwiastków powodowały naturalne zainteresowanie złotem (III) jako potencjalnym pierwiastkiem do stworzenia kompleksów o działaniu antynowotworowym. Jednakże w porównaniu z platyną (II), analogi złota (III) okazały się być niestabilne, wrażliwe na światło i łatwo redukujące do metalicznego złota (złota (I)) w warunkach fizjologicznych. [39][47][55][57][58][59]. Stabilizację stopnia utleniania można osiągnąć poprzez dobór odpowiednich ligandów [47][55][58][59][60]. Antyproliferacyjne właściwości kompleksów złota z ligandami zostały opisane wobec komórek linii

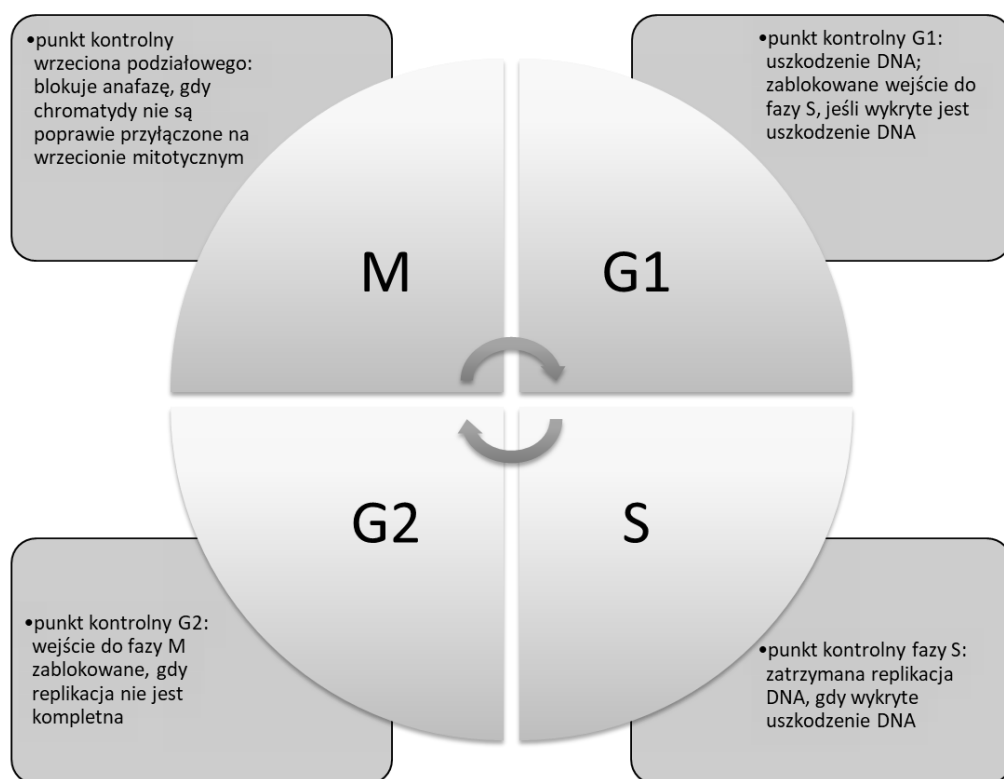
A2780 (komórki raka jajnika) [61], CCRF-CEM (komórki białaczki) [47], A549 (gruczolakorak płuc) [55]. Wartość parametru IC_{50} dla tej linii opisana została na poziomie mikromolarnym [47]. Kompleksy złota (III) z ligandami pirydynowymi wykazują w badaniach *in vitro* większą efektywność od stosowanych obecnie w chemioterapii leków [39]. Stwierdzono w przeprowadzonych dotychczas badaniach, że ligand pirydynowy ma kluczowe znaczenie zarówno dla stabilizacji centrum Au (III), jak i dla dostarczenia leku do komórki [47]. Ponadto kompleksy o geometrii płaskiej kwadratowej zawierające pierścień aromatyczny taki jak terpirydyna: 1,10-fenantrolina lub 2,2'-bipirydyna mogą łączyć się z DNA powodując interkalację pomiędzy parami łańcucha [39]. Generalnie, badania pokazują zgoła inny mechanizm działania kompleksów złota, niżby wynikało z ich podobieństwa do związków platyny. W badaniach kompleksów złota (III) wykazano ich dużą cytotoksyczność, z jednocześnie marginalnym uszkodzeniem DNA, słabym oddziaływaniem na cykl komórkowy, co w ogólności sugeruje niewielki wpływ na funkcje związane z DNA (zupełnie odwrotnie niż w przypadku cisplatyny). Niektóre z opisanych dotychczas kompleksów złota (III) wykazują interakcje z DNA, jednakże mechanizmy uszkodzenia DNA i śmierci komórkowej wydają się być odmienne od tych, wywołanych przez leki platynowe. Istnieje hipoteza, że związki złota mogą wywoływać działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne, poprzez działanie antymichondrialne [47][59]. Spośród nowych kompleksów metali używanych w terapii przeciwnowotworowej, kompleksy złota charakteryzują się inną farmakokinetyką i farmakodynamiką niż kompleksy platynowe, a także silnym efektem inhibitującym wzrost komórek nowotworowych, co czyni je dobrymi kandydatami do terapii przeciwnowotworowych [59].

Podsumowując kompleksy złota (III) tworzą interesującą grupę potencjalnych leków cytotoksycznych, które mają szansę stać lekami antynowotworowymi [61]. Złoto (III) zyskało zainteresowanie naukowców poprzez jego wysoką cytotoksyczność *in vitro* oraz inny mechanizm działania w porównaniu do cisplatyny. W przypadku kompleksów platyny (II) głównym celem jest DNA, podczas gdy dla kompleksów złota zdaje się nim być zatrzymanie działania kluczowych białek, co wydaje się być głównym mechanizmem działania tych kompleksów. Chelatacja multidentnych ligandów

zwiększa stabilność strukturalną kompleksów złota (III). Wybór odpowiedniego ligandu jest ważny również ze względu na utlenianie/redukcję złota (III) do złota (I). Dlatego nowe, obiecujące antynowotworowe kompleksy złota (III) zawierają azotowo donorowy, poliaromatyczny ligand, taki jak np. terpirydyna czy fenantrolina, aby zachować własności antynowotworowe złota (III) [38][61][62]. Literaturowo kompleksy złota (III) również wykazywały wyższą cytotoksyczność względem cisplatyny dla ludzkich komórek nowotworowych. Wykazano również, że położenie tlenu względem azotu ma minimalne znaczenie jeśli chodzi o własności antyproliferacyjne kompleksu [62].

4. Cykl komórkowy komórek zdrowych i nowotworowych

Cykl komórkowy to proces, podczas którego komórka kopiuje swój materiał genetyczny (DNA) i dzieli się, a więc z jednej komórki powstają dwie komórki potomne, o tym samym kodzie DNA [63]. Cały proces nazwany jest mitozą i składa się z czterech faz (rys. 5):



Rysunek 5. Cykl komórkowy z punktami kontrolnymi [63]

- faza G1 (ang. *gap phase*) to faza, podczas której komórka powiększa się i przygotowuje do syntezy nici DNA, trwa ona około 6-8 godzin,

- faza S (ang. *synthesis*) to faza, podczas której syntezowane są nici DNA, których długość determinowana jest ilością DNA komórkowego, faza ta zależna jest od typu komórek,

- faza G2 (ang. *second gap*) to faza, w której komórka przygotowuje się do podziału, trwa około 3-5 godzin,

- faza M (ang. *mitosis*) to faza, w której zachodzi podział komórkowy, trwa zwykle około 1 godziny. Składa się z 4 podfaz – profazy, metafazy, anafazy i telofazy [63].

Cykl komórkowy jest siecią oddziaływujących białek, które otrzymują sygnały z wnętrza komórki i z zewnątrz, sygnały te są integrowane i podejmowana jest decyzja o przeznaczeniu komórki - podziału komórkowego, przejścia do procesów naprawczych lub na drogę śmierci komórkowej. Na tą decyzję wpływają nie tylko zwykłe białka, ale także onkogeny oraz supresory, które zakłócają mechanizmy kontroli cyklu komórkowego [63].

Komórka podczas przechodzenia cyklu komórkowego, kontrolowana jest w punktach kontrolnych, które określają zdolność i gotowość komórki do podziału. I tak, gdy komórka zbliża się do końca fazy G1, kontrolowana jest w punkcie kontrolnym G1/S, w którym jest sprawdzana pod kątem uszkodzeń DNA. Komórki z nienaruszonym DNA kontynuują cykl komórkowy przechodząc do fazy S, komórki z uszkodzonym DNA kierowane są na ścieżki naprawy, bądź śmierci komórkowej. Kolejnym punktem kontrolnym jest punkt w fazie G2. W tym punkcie ważną rolę pełnią enzymy – kinazy, które są odpowiedzialne za kontrolę etapów cyklu komórkowego. Podczas prawidłowego działania tych enzymów i kompleksów, które tworzą, regulatory te kontrolują śmierć/naprawę komórek uszkodzonych. Mutacje genetyczne, występujące w przypadku rozwoju nowotworów, powodują wadliwe działanie tych kompleksów, co pozwala na niekontrolowane namnażanie się komórek nieprawidłowych, prowadząc do karcynogenezy [63].

Pierwszy punkt kontrolny blokuje przejście komórki z fazy G1 do fazy S, jeśli genom potrzebuje naprawy. Drugi punkt kontrolny, znajdujący się w fazie S spowalnia bądź zatrzymuje replikację DNA w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Trzeci punkt kontrolny nie pozwala na przejście z fazy G2 do M, jeśli replikacja DNA w fazie S się nie zakończyła [63].

Punkty kontrolne cyklu komórkowego nakładają kontrolę jakości i zapewniają, że faza jest prawidłowo zakończona i dozwolone jest przejście do kolejnej fazy cyklu. Komórka nie zostanie dopuszczona do przejścia do fazy S, dopóki nie będą spełnione wszystkie punkty fazy G1. Zostanie ona zablokowana przed wejściem do fazy G2, dopóki chromosomalne DNA nie zostanie prawidłowo zreplikowane. Podobnie z przejściem w fazie M (przejście do anafazy) nie stanie się to dopóki chromosomy nie będą prawidłowo połączone na wrzecionie mitotycznym podczas metafazy. Komórka nie może przejść do fazy S lub M, jeśli jej DNA jest uszkodzone lub nie zostało jeszcze naprawione [63].

Działania punktów kontrolnych mają również swój wpływ na formowanie się nowotworów. W miarę postępu rozwoju nowotworu komórki nowotworowe korzystają z eksperymentowania z różnymi kombinacjami i permutacjami zmutowanych alleli, próbując różnych i sprawdzając, które dają największe możliwości proliferacji. Zmienność oraz genomowa niestabilność nie są związane z normalnym cyklem komórkowym, dopóki punkty kontrolne działają tak jak powinny. Oprócz nabywania zmienionych genów kontrolujących wzrost (np. aktywacja onkogenów, dezaktywacja supresorów guzów nowotworowych), wiele typów nowotworów potrafi „wyłączyć” punkty kontrolne cyklu komórkowego. To powoduje szybki rozrost zmutowanych komórek [63].

Protoonkogeny są pozytywnymi regulatorami cyklu komórkowego. Jednak kiedy ulegną mutacji stają się onkogenami, które mogą stać się kancerogenami [64].

Regulatory cyklu komórkowego pełnią ważną rolę w podziałach komórkowych. Wpływają na zaistnienie każdego kroku cyklu komórkowego. Jednymi z najważniejszych białek regulujących cykl komórkowy są cykliny.

Rozróżniane są cztery rodzaje:

- cykliny G1 (cykliny D)
- cykliny G1/S (cykliny E)
- cykliny S (cykliny A)
- cykliny M (cyklina B).

Każda z nich bierze udział w konkretnej fazie cyklu komórkowego, dlatego ich poziomy w czasie trwania cyklu mogą być różne [65]. Cykliny aktywują, bądź inaktywują odpowiednie białka w komórce, aby umożliwić komórce kontynuację cyklu komórkowego. Współdziałają z kinazami zależnymi od cyklin (Cdk). Gdy cyklina zostaje dołączona do kinazy Cdk, wysyła ona kinazę Cdk do odpowiednich białek docelowych dla określonego etapu cyklu komórkowego [65].

Geny supresorowe nowotworów są negatywnymi regulatorowymi białkami. Kiedy są aktywne potrafią uchronić komórkę przed niekontrolowanymi podziałami. Najbardziej poznanymi do tej pory genami supresorowymi są p53 i p21. Mutacje genu p53 występują w połowie nowotworów. P53 pełni ważną rolę w punkcie kontrolnym cyklu G1. Mutacja w tym punkcie prowadzi do tego, że uszkodzenie DNA nie zostaje odnotowane, funkcjonalne p53 nie może poprowadzić komórki na drogę śmierci komórkowej, ani na drogę naprawy. Cykl komórkowy jest kontynuowany. Utrata funkcji p53 oddziałuje na cały cykl komórkowy. Zmutowany p53 traci możliwość wyzwolenia produkcji p21, bez adekwatnego poziomu białka p21 nie jest możliwa blokada Ckd. Co prowadzi komórkę bezpośrednio do fazy S, i skutkuje powstaniem dwóch komórek potomnych z mutacją genu p53. Takie komórki szybko akumulują zarówno onkogeny, jak i niefunkcjonalne geny supresorowe. Rezultatem czego jest wzrost nowotworu [64].

Powstawanie nowotworu wiąże się z mutacjami regulatorów cyklu komórkowego. Mogą to być regulatory pozytywne, które ulegają nadekspresji i stają się onkogenne, lub regulatory negatywne, czyli supresory nowotworu mogące stać się nieaktywne [66]. Supresorem nowotworu jest białko p53, które

działa głównie w punkcie kontrolnym fazy G1, zatrzymuje ono kontynuację cyklu komórkowego, pod wpływem uszkodzenia DNA. Gdy białko odbiera sygnał o uszkodzeniu DNA, aktywowane jest białko p53, które uruchamia inhibicję cyklu komórkowego. Jeśli uszkodzenia są możliwe do naprawy, wtedy komórka kierowana jest na drogę naprawy DNA. Gdy DNA zostanie naprawione, p53 opuszcza komórkę i możliwa jest kontynuacja cyklu komórkowego. Jeśli uszkodzenia są zbyt duże, wtedy p53 uruchamia apoptozę, czyli programowaną śmierć komórki. Mutacja p53 jest najczęściej spotykaną mutacją w komórkach nowotworowych [66].

5. Mechanizmy śmierci komórkowej

Komórki w organizmie człowieka mogą ulegać degradacji na kilka sposobów. Należą do nich: apoptoza, nekroza, katastrofa mitotyczna, autofagia oraz starzenie się [67].

- **Apoptoza** jest procesem fizjologicznym [67]. Z punktu widzenia organizmu jest to najbardziej pożądana droga utylizacji komórek uszkodzonych, ponieważ nie wpływa na resztę organizmu [68]. Nazywana jest programowaną śmiercią komórki, czyli jej schemat jest stały i niezależny od innych czynników. Pierwszym sygnałem są zmiany w jądrze komórkowym, gdzie chromatyna się kondensuje, następuje obkurczenie jądra i jego fragmentacja. Kolejnym krokiem jest kondensacja cytoplazmy i wytworzenie na powierzchni komórki pęcherzyków. Wytwarzane są ciała apoptotyczne zawierające chromatynę, cytoplazmę oraz organelle komórkowe. Końcową fazą tego procesu jest fagocytoza ciałek [67]. Jest to proces czynny, wymaga dużego nakładu energii. Może przebiegać na różne sposoby. Najlepiej poznanymi są wewnętrzny oraz zewnętrzny szlak apoptozy, w zależności od rodzaju komórki oraz czynnika indukującego.

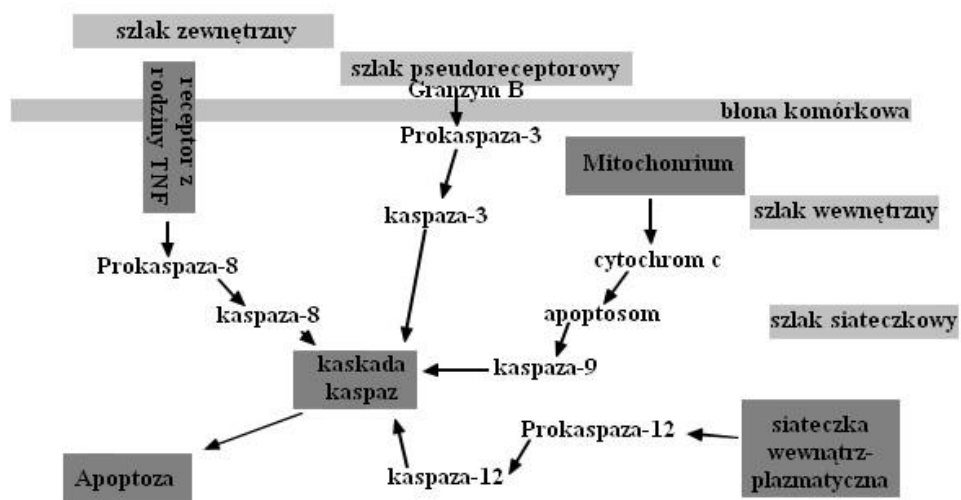
- **Szlak zewnętrzny** związany jest z receptorami błonowymi i ich ligandami. Są to receptory czynnika nekrozy TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*), np. TNFR1, TNFR2, Fas/CD95/Apo1. Ligand wiąże się z receptorem błonowym (TNF- α , FasL), następnie przekazuje sygnał śmierci do białka adaptorowego FADD (ang. *Fas Associated Death Domain*), które łączy się z domeną śmierci DD receptora (ang. *Death Domain*). A ten kompleks z kolei łączy się

z prokaspazą 8 lub 10 (białka efektorowe). Uruchamiana jest kaskada kaspaz wykonawczych prowadzących do śmierci komórkowej [67].

Szlak zewnętrzny może zostać indukowany pod wpływem ograniczonej ilości substancji odżywczych, czynników wzrostowych, czy też wzrostu stężenia hormonów. Może zostać również wywołany pod wpływem działania czynników chemicznych – np. cytostatyków, czynników fizycznych – np. promieniowania [69].

- Szlak wewnętrzny, inaczej mitochondrialny. Zostaje aktywowany poprzez wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, zaburzenia transportu elektrolitów lub wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Pod wpływem czynników stresogennych z mitochondriów do cytoplazmy uwolniony zostaje cytochrom c. Dzieje się to poprzez otwarcie kanalików mitochondrialnych, na które oddziałują m. in. białka Bax, Bak oraz Bcl-2. Po opuszczeniu organelli cytochrom c może połączyć się z czynnikiem Apaf 1 (ang. *Apoptotic protease activating factor 1*) oraz kaspazą 9 (nieaktywną). Taki kompleks aktywuje kaspazę 9, która z kolei wpływa na kaspazy wykonawcze, które prowadzą do proteolizy białek oraz zmian w morfologii komórki, charakterystycznych dla apoptozy [67]. Najbardziej do tej pory poznanymi regulatorami apoptozy są białka z rodziny Bcl-2, tj. inhibitory (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, Mcl-1) i promotory (Bid, Bad, Bak, Bax, Noxa) apoptozy. Białko p53 opisywane jest jako białko o działaniu proapoptotycznym. Pod wpływem czynników stresogennych, białkowy produkt genu p53 oddziałuje na przepuszczalność błony mitochondrialnej (zwiększa ją), co powoduje indukcję ekspresji białek proapoptotycznych zależnych od p53 i skutkuje uwolnieniem cytochromu c [67][69]. Pod wpływem czynników stresogennych białko p53 wydostaje się do cytoplazmy, a tam tworzy kompleks z białkami Bcl-2/Bcl-X, uwalnia cytochrom c z przestrzeni międzykomórkowej oraz prowadzi do aktywacji kaspaz [69].

Apoptoza może przebiegać różnymi szlakami: wewnętrznym (mitochondrialnym, p53-zależnym), zewnętrznym (receptorowym), wykorzystującym perforyny i granzym B (pseudoreceptorowym) oraz wykorzystującym retikulum endoplazmatyczne (siateczkowym) [69] (rys. 6).



Rysunek 6. Szlaki apoptozy [69]

Niezależnie od szlaku aktywacji śmierci komórkowej przy pomocy apoptozy, w komórce aktywowane są kaspazy. Można je podzielić na kaspazy indukujące (aktywatorowe; -2, -8 i -9, -10 i -12) oraz wykonawcze (egzekutorowe; -3, -6, -7). Do momentu inicjacji procesu apoptozy pozostają one nieaktywne w postaci pro-kaspaz. Cechą charakterystyczną dla kaspaz jest to, że aktywacja jednej wiąże się z aktywacją kolejnej, nazywany jest ten proces kaskadą kaspaz. Ich działanie w konsekwencji prowadzi do zaburzeń funkcji i struktury komórki, co prowadzi do jej śmierci [69].

Istotnym elementem wewnętrznego szlaku apoptozy jest białko p53, zwane strażnikiem genomu. Jego zadaniem jest hamowanie podziału komórki, gdy jej DNA jest uszkodzone. Jeśli uszkodzeń nie da się naprawić, p53 kieruje komórkę na drogę śmierci apoptotycznej [69].

- **Nekroza** jest w przeciwieństwie do apoptozy procesem biernym, a także patologicznym. Może zostać indukowana pod wpływem odpowiednio wysokiego natężenia czynników szkodliwych (przekraczających próg odporności komórek). Podczas tego rodzaju śmierci komórkowej, dochodzi do destrukcji organelli

komórkowych, komórka pęcznieje, aż dochodzi do dezintegracji błony komórkowej, co powoduje rozlanie składników komórkowych do przestrzeni międzykomórkowej i wywołania odczynu zapalnego w organizmie. Taki odczyn nie występuje w przypadku programowanej śmierci komórki. Typowym objawem nekrozy jest wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu, wynika on z zaburzeń w strukturze błony komórkowej, co powoduje bierny napływ wody i jonów do wnętrza komórki. Z kolei wysoki poziom jonów Ca^{2+} powoduje aktywację nukleaz tnących DNA. Kolejnym etapem jest uwolnienie enzymów hydrolitycznych z lizosomów, następuje rozpad organelli i w efekcie całej komórki [67].

Nekroza nazywana jest też martwicą. Pod wpływem czynników mechanicznych lub fizycznych zaburzona zostaje równowaga osmotyczna w komórce. Skutkuje to zahamowaniem metabolicznym, spadkiem poziomu ATP, zaburzeniu transportu elektronów, napływ wody i jonów do wnętrza komórki, obrzęk organelli, rozpad i uwolnienie organelli do przestrzeni międzykomórkowej. W efekcie prowadzi to do rozwoju stanu zapalnego w organizmie [69].

- **Katastrofa mitotyczna** to „śmierć komórki zachodząca podczas mitozy w rezultacie połączenia niesprawnego funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego i uszkodzenia komórki” [65][67]. Cechami charakterystycznymi tego rodzaju śmierci komórkowej są aberracje chromosomowe, fragmentacja jądra, formowanie dużych komórek, zawierających jedno duże jądro lub kilka mniejszych [67]. Związana jest z nieprawidłowościami występującymi podczas mitozy [69]. Cechami charakterystycznymi dla katastrofy mitotycznej jest brak/opóźnienie wejścia komórki w fazę G1/S cyklu komórkowego lub zatrzymanie w fazie G2 [67][69].

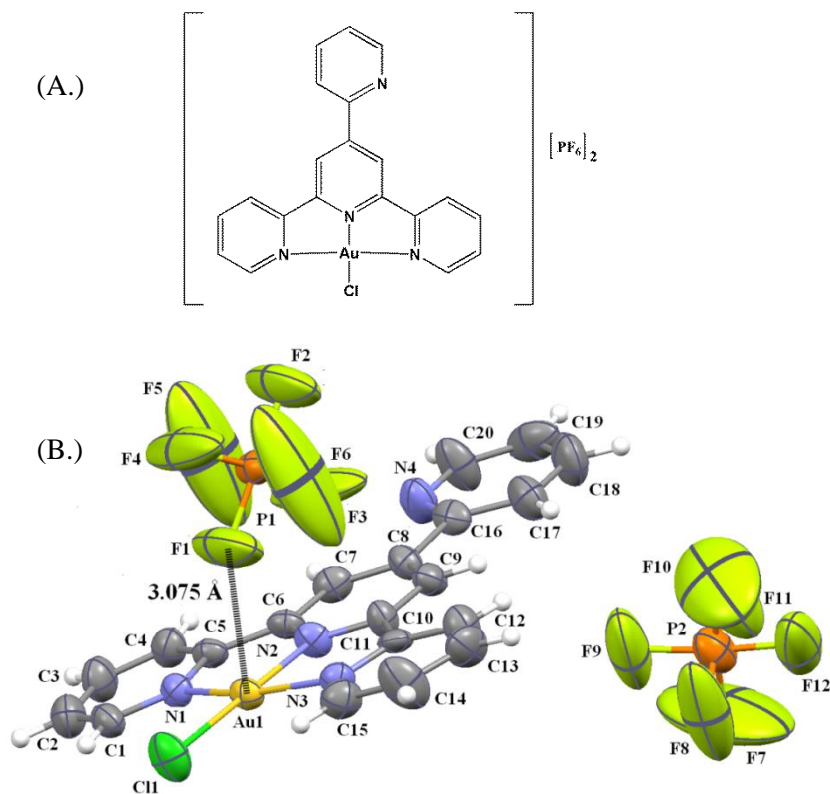
- **Autofagia** jest określana jako II typ programowanej śmierci komórkowej. Występuje we wszystkich komórkach, posiadających jądro [67]. Aktywowana jest wtedy, gdy komórka ma niedobór składników odżywczych lub uszkodzony jest któryś z elementów składowych komórki. Jest to ewolucyjny proces, którego zadaniem jest utrzymanie komórki przy życiu w warunkach narażenia na szkodliwe czynniki. Proces ten charakteryzuje się degradacją składników komórkowych w jej wnętrzu, w tzw. wakuolach autofagosomalnych [69].

IV. Część praktyczna

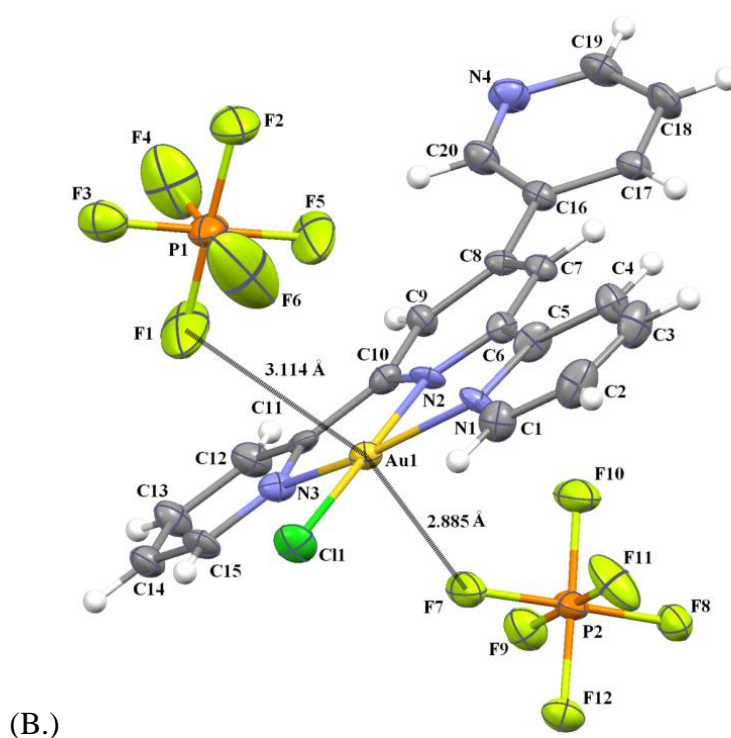
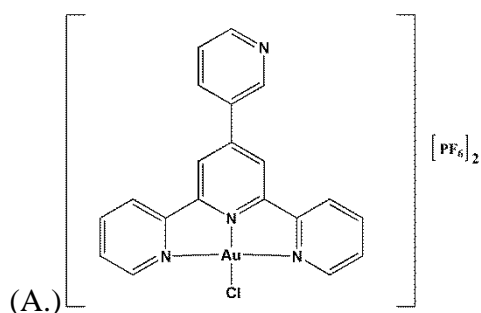
1. Badane związki oraz referencje

Przedmiotem pracy są dwa kompleksy złota (III) zawierające pochodne 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})]\text{PF}_6)_2$ (skrót: Au5) (rys. 7) oraz $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})](\text{PF}_6)_2$ (skrót: Au14) (rys.8), gdzie R^1 to 2-pirydył, zaś R^2 to 3-pirydył.

W strukturze tych związków znajduje się kation złożony z cząsteczki liganda terpirydynowego, złota i chloru oraz dwa aniony heksafluorofosforanowe. Centrum koordynacyjne w kompleksach Au (III) jest izoelektryczne. Złoto w obu cząsteczkach koordynuje w geometrii płasko kwadratowej, podobnie jak platyna w cząsteczce cisplatyny [70]. Ta analogia strukturalna daje nadzieję na przeciwnowotworową aktywność kompleksów złota (III) [38] i inspiruje do przeprowadzenia badań zaplanowanych w ramach niniejszej pracy.



Rysunek 7. Wzór strukturalny kompleksu złota (III) z pochodną 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})]\text{PF}_6)_2$ – skrót Au5 (A.) oraz jego struktura krystalograficzna (B.) [71]



Rysunek 8. Wzór strukturalny kompleksu złota (III) z pochodną 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R2-terpy})]\text{PF}_6)_2$ – skrót Au14 (A.) oraz jego struktura krystalograficzna (B.) [71]

Kompleksy złota (III) z pochodnymi 2,2':6',2''-terpirydyny zostały zsyntezowane i scharakteryzowane w zespole prof. Barbary Machury z Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego przez mgr Katarzynę Czerwińską. Synteza, charakterystyka fizyko-chemiczna obejmująca m.in. potwierdzenie struktury za pomocą badań krystalograficznych i zbadanie stabilności związków Au (III) w roztworze buforu fizjologicznego przy pomocy czasowych pomiarów widm absorpcyjnych, została dokładnie przedstawiona w pracy doktorskiej Katarzyny Czerwińskiej – „Związki koordynacyjne wybranych jonów metali przejściowych

z ligandami triiminowymi – synteza, struktura, właściwości fotoluminescencyjne i magnetyczne oraz aktywność katalityczna i biologiczna”.

2. Badania fizyczne

2.1. Badania spektrofotometryczne

W celu wykonania widm absorpcyjnych i emisyjnych, związki Au5 oraz Au14 rozpuszczano w minimalnej ilości DMSO (Sigma), a następnie tak uzyskany stock rozcieńczono DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma), tak aby końcowe stężenie wynosiło około $5 \cdot 10^{-5}$ M. Do pomiarów spektrofotometrycznych użyto kuwety kwarcowej, której droga optyczna wynosiła 1 cm. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej.

2.1.1. Widma absorpcyjne

Widma absorpcyjne mierzone były na spektrofotometrze HITACHI U-2900, który wyposażony jest w dwa źródła światła: lampę deuterową oraz wolframową. Zakres spektralny spektrofotometru to 190-1100 nm, dodatkowo wyposażony jest on w monochromator z siatką dyfrakcyjną o wysokiej rozdzielczości. Pomiary zostały przeprowadzone dla kilku stężeń związków w temperaturze pokojowej:

- Au5: $3.27 \cdot 10^{-5}$ M, $2.68 \cdot 10^{-5}$ M, $2.098 \cdot 10^{-5}$ M, $1.67 \cdot 10^{-5}$ M, $1.34 \cdot 10^{-5}$ M, $1.07 \cdot 10^{-5}$ M, $8.59 \cdot 10^{-6}$ M, $6.87 \cdot 10^{-6}$ M, $5.50 \cdot 10^{-6}$ M, $4.4 \cdot 10^{-6}$ M
- Au14: $1.67 \cdot 10^{-5}$ M, $1.33 \cdot 10^{-5}$ M, $1.07 \cdot 10^{-5}$ M, $8.57 \cdot 10^{-6}$ M, $6.85 \cdot 10^{-6}$ M, $5.48 \cdot 10^{-6}$ M, $4.38 \cdot 10^{-6}$ M, $3.51 \cdot 10^{-6}$ M, $2.80 \cdot 10^{-6}$ M

Szybkość skanowania wynosiła: 400 nm/min, krok: 2 nm, szerokość szczeliny: 1.5 nm, zakres spektralny: 230-1100 nm. Wyniki zostały opracowane oraz zinterpretowane przy użyciu oprogramowania UV-Solution 1344331-15.

2.1.1.1. Zależność absorpcji od pH roztworu

Zależność widm absorpcyjnych kompleksów złota od pH roztworu, badano w zakresie pH zarówno rosnącym, jak i malejącym: 2.0-11.5 pH, 11.5-2.0 pH. Wartość pH zmieniana była przy użyciu stężonych roztworów HCl oraz NaOH. Szybkość skanowania wynosiła: 400 nm/min, krok: 2 nm, szerokość szczeliny: 1.5 nm, zakres spektralny: 225-600 nm. Roztwory przygotowywano

analogicznie, jak do pomiarów absorpcyjnych i emisyjnych. Pomiarów dokonywano w temperaturze pokojowej. Badania przeprowadzono na pH-metrze firmy HANNA instruments HI 2213.

2.1.2. Widma emisyjne

Widma emisyjne mierzone były na spektrofluorymetrze HITACHI F-7000, który wyposażony jest w lampę ksenonową o mocy 150 W oraz monochromator z siatką dyfrakcyjną o wysokiej rozdzielczości. Pomiary zostały przeprowadzone dla najwyższych stężeń, tj. dla związku Au5: $3.27 \cdot 10^{-5}$ M, dla Au14: $1.67 \cdot 10^{-5}$ M, tak aby otrzymać maksymalny sygnał fluorescencyjny. Szybkość skanowania wynosiła: 400 nm/min, krok: 2 nm, szerokość szczelin emisyjnej oraz ekscytacyjnej: 5 nm, zakres spektralny: 300-900 nm. Wyniki zostały opracowane oraz zinterpretowane przy użyciu oprogramowania FL-Solution 5J14050-05.

3. Badania biologiczne

3.1. Linie komórkowe

Badania biologiczne zostały przeprowadzone na panelu linii komórek nowotworowych:

- HCT116 – ang. *Homo sapiens colon colorectal carcinoma* – ludzkiego raka okrężnicy
- HCT116p53^{-/-} - ang. *Homo sapiens colon colorectal carcinoma with p53 gene silenced* – ludzkiego raka okrężnicy z wyciszonym genem p53
- A549 – ang. *Homo sapiens epithelial lung carcinoma* – ludzkiego gruczolakoraka płuc
- MCF7 – ang. *Homo sapiens breast adenocarcinoma cell line* – ludzkiego raka piersi
- MCF7/DOX – ang. *Homo sapiens breast adreno carcinoma cell line with the doxorubicin resistance* – ludzkiego raka piersi odpornego na doksorubicynę
- A172 – ang. *Homo sapiens brain glioblastoma* – ludzkiego glejaka
- Me45 – ang. *Homo sapiens malignant melanoma* – ludzkiego czerniaka złośliwego
- K562 – ang. *Homo sapiens bone marrow chronic myelogenous leukemia* – ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej.

Ponadto doświadczenia wykonane były na zdrowych liniach komórkowych:

- NHDF – ang. *Normal Human Dermal Fibroblast* – ludzkich fibroblastów
- BEAS 2B – ang. *Homo sapiens lung bronchus normal* – ludzkiego nabłonka oskrzeli
- HaCaT – ang. *Homo sapiens aneuploid immortal keratinocyte* – ludzkich nienowotworogennych, nieśmiertelnych keranocytów
- GM07492 – ang. *Normal Human Fibroblast* – ludzkich zdrowych fibroblastów.

Wszystkie linie komórkowe zostały uzyskane kilka lat temu z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów z Gliwickiego Oddziału Centrum Onkologii. W chwili obecnej są własnością Uniwersytetu Śląskiego, Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii, Instytutu Fizyki, Zakładu Fizyki Ciała Stałego. Linie komórkowe przechowywane są w oparach ciekłego azotu w banku komórek.

3.2. Hodowla *in vitro*

Hodowla komórkowa prowadzona była w sterylnych warunkach. Komórki hodowane były w butelkach hodowlanych firmy Nunc o powierzchni 75cm². Odpowiednie warunki hodowli *in vitro* zapewniał inkubator CO₂-Heracell™ 150i (ThermoFisher), tj.: temperatura 37°C, wilgotność 80%, nasycenie CO₂ – 80%.

Do prowadzenia hodowli linii komórkowych wykorzystywano standardową pożywkę hodowlaną Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM F-12, Sigma-Aldrich), wzbogaconą 12% inaktywowaną płodową surowicą bydlęcą (FBS inaktywowana termicznie, EUR_X) dla komórek linii nowotworowych lub 15% nieinaktywowaną płodową surowicą bydlęcą (FBS, EUR_X) dla komórek linii zdrowych. Dodatkowo medium zawierało również antybiotyki Penicylina-Streptomycyna (Sigma-Aldrich) w ilościach zalecanych przez producenta: 1 ml/100 ml pożywki. Komórki utrzymywane były w hodowli dzięki pasażowaniu ich przy pomocy roztworu 0,25% trypsyny EDTA (Sigma-Aldrich), przy konfluencji powyżej 80% (w odstępie 3-4 dni).

3.3. Cytotoksyczność

Dla otrzymania wartości parametru opisującego toksyczność badanego związku na linię komórkową należy wykonać test cytotoksyczności, który w wyniku daje informację o wartości parametru IC_{50} (ang. *inhibitory concentration*). Parametr ten określa dawkę, która po podaniu powoduje 50% inhibicję czynności biologicznej komórek. Wyznacza się go konstruując krzywą dawka-odpowiedź (ang. *dose-response curve*) [72].

Toksyczność badanych związków była wyznaczana przy pomocy testów: testu kolorymetrycznego MTS (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) lub testu luminescencyjnego Cell-Titer Glo® (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega).

Ponadto, dla każdego z testów zmierzona została próba ślepa (bez komórek), tj. roztwór 100 μ l DMEM F-12 bez czerwieni fenolowej i 20 μ l MTS dla testu MTS, a dla testu Cell-Titer Glo® roztwór medium hodowlanego z taką samą ilością odczynnika Cell-Titer Glo®. Frakcję komórek żywych wyliczano na podstawie:

$$SF = \frac{A}{A_k} \times 100\%,$$

gdzie:

SF – frakcja przeżywająca (ang. *survival fraction*)

A - wartość absorbancji/luminescencji dla komórek traktowanych

A_k – wartość absorbancji/luminescencji dla komórek kontrolnych

Każdy eksperyment przeprowadzano w trzech powtórzeniach, a wyniki z 3-4 niezależnych eksperymentów, przedstawiono w formie wartości parametru IC_{50} , który to został wyliczony przy pomocy programu GraphPad Prism 5.

3.3.1. MTS

W celu przeprowadzenia testów cytotoksyczności komórki znajdujące się w wykładniczej fazie wzrostu trypsynizowano, a następnie wysiewano w pożywcze hodowlanej DMEM F-12 na 96-dołkowe płytki (Nunc) w ilościach przedstawionych w tabeli 1. Po 24 godzinach medium hodowlane było

zastępowane świeżą pożywką, zawierającą kolejne rozcieńczenia badanej pochodnej. W komórkach kontrolnych (nieotraktowanych) po tym czasie medium hodowlane było zastępowane świeżym. Analizowane związki rozpuszczano początkowo w sterylnym DMSO (dimetylosulfotlenek, Sigma-Aldrich), a następnie rozcieńczano medium hodowlanym, tak aby uzyskać stężenia końcowe w zakresie 0,01 μM - 100 μM . Stężenia przygotowywane były tak, by zawartość DMSO w roztworach końcowych nie przekraczała 0,33%. Inkubacja ze związkiem trwała 72 godziny. W przypadku przeprowadzania testu MTS, po upływie tego czasu roztwór związku był usuwany, a do każdego dołka na płytce 96-dołkowej dodawano 100 μl medium DMEM bez czerwieni fenolowej (Sigma-Aldrich), następnie przeprowadzana była procedura testu MTS, zgodnie z protokołem CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega). Do każdego dołka płytki dodawano po 20 μl odczynnika MTS, a następnie płytka umieszczana była w inkubatorze CO₂ na okres 40-60 min (w zależności od inkubowanej linii komórkowej). Po upływie tego czasu dokonywany był spektrofotometryczny pomiar absorbancji przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika płytek wielodołkowych SYNERGY4 (BioTek Instruments).

3.3.2. Cell-Titer Glo®

Dla testu Cell-Titer Glo® procedura wysiewania płytek oraz traktowania związkami była identyczna, jak w opisie testu MTS. Po upływie 72 godzin inkubacji z badanym związkiem do zawartości każdego dołka dodawano taką samą ilość odczynnika Cell-Titer Glo®, wg protokołu producenta CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Następnie płytka była umieszczana na wytrząsarce na 2 minuty, kolejno inkubowana była 10 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie wymaganego czasu zlizowane komórki ze standardowej 96-dołkowej płytki hodowlanej były przenoszone na białą płytkę 96-dołkową (VWR) i następował odczyt luminescencji.

Tabela 1. Ilość komórek wysiewanych do testów cytotoksyczności oraz rodzaj użytego testu

Linia komórkowa	Ilość komórek wysiewanych / dołek	Test cytotoksyczności
HCT116	5000	MTS
HCT116p53 ^{-/-}	5000	MTS
A549	1500	MTS
MCF7	3000	MTS/Cell-Titer Glo®
A172	2000	Cell-Titer Glo®
Me45	2000	Cell-Titer Glo®
K562	5000	Cell-Titer Glo®
NHDF	4000	MTS
BEAS 2B	3000	MTS
HaCaT	2500	Cell-Titer Glo®
GM07492	4000	Cell-Titer Glo®

3.4. Analiza cyklu komórkowego

Do eksperymentu analizy cyklu komórkowego badanej pochodnej (Au5), komórki linii HCT116 znajdujące się w wykładniczej fazie wzrostu trypsynizowano, a następnie wysiewano w pożywce hodowlanej DMEM/F12 (+12% FBS) na szalki Petriego (o średnicy 3 cm) (Nunc) w ilościach:

- Linia HCT116 dla grup kontrolnych:
 - 300 000 komórek/szalkę/1ml dla 1., 2., 3., 6., 12. oraz 24 godz. inkubacji
 - 200 000 komórek/szalkę/1ml dla 48 godz. inkubacji
 - 150 000 komórek/szalkę/1ml dla 72. oraz 96 godz. inkubacji.
- Linia HCT116 inkubowanych ze związkiem:
 - 250 000 komórek/szalkę/1ml dla 1., 2., 3., 6., 12. oraz 24 godz. inkubacji

- 200 000 komórek/szalkę/1ml komórek/szalkę/1ml dla 48 godz. inkubacji
- 150 000 komórek/szalkę/1ml dla 72. oraz 96 godz. inkubacji.

Po ok. 24 godzinach w grupach kontrolnych medium hodowlane zastępowano świeżym medium hodowlanym, a w pozostałych grupach medium hodowlanym zawierającym rozcieńczenia badanej pochodnej równe wartości IC_{50} ($0,46\mu M$). Inkubacja ze związkiem trwała 1., 2., 3., 6., 12., 24., 48., 72. i 96 godzin. Po upływie wymaganego czasu, roztwór związku zbierano do probówki, komórki trypsynizowano poprzez dodanie 1 ml trypsyny EDTA (Sigma), następnie komórki zbierano do probówki i neutralizowano trypsynę 2 ml medium hodowlanego. Komórki wirowano przez 5 minut w $4^{\circ}C$ i przy 1300 rpm, a następnie dwukrotnie do komórek dodawano 1 ml PBS i kolejny raz wirowano. Na koniec komórki utrwalano zimnym ($-20^{\circ}C$) 70% etanolem (1 ml). Tak przygotowane próbki przechowywano w $-20^{\circ}C$. Przed przystąpieniem do pomiaru na cytometrze, komórki odwirowano z prędkością 1300 rpm przez 3 min. Następnie komórki przepłukano 500 μl PBS i kolejny raz zwirowano (1300rpm/3min). Kolejno komórki zawieszono w 50 μl PBS i dodano 50 μl RNAzy (Sigma) w rozcieńczeniu 100 $\mu g/ml$ w PBS. Komórki były inkubowane z RNAzą w $37^{\circ}C$ przez 15 min. Po inkubacji do każdej z probówek dodawano 250 μl jodku propidyny (PI, Sigma) w rozcieńczeniu 100 $\mu g/ml$ w PBS. Bezpośrednio przed pomiarem probówki były worteksowane. Pomiar dokonywany był na cytometrze przepływowym BD FACSAria™ II.

Pomiary cytometryczne dla linii MCF7 przeprowadzono w podobny sposób. Komórki raka piersi wysiewano w pożywkę hodowlanej DMEM/F12 (+12% FBS) na szalki Petriego (o średnicy 3cm) (Nunc) w ilościach (takich samych dla grupy kontrolnej i inkubowanej ze związkiem – Au14, oraz referencją - cisplatyną):

- 600 000 komórek/szalkę/1.5 ml dla 3. oraz 6 godzin inkubacji
- 500 000 komórek/szalkę/1.5 ml dla 12. oraz 24 godzin inkubacji
- 400 000 komórek/szalkę/1.5 ml dla 48 godzin inkubacji.

Komórki linii MCF7 inkubowane były ze związkiem Au14 w stężeniu 1 μM , cisplatyną w stężeniu 20 μM oraz ze świeżym medium hodowlanym (grupy kontrolne) (+12% FBS). Po upływie wymaganego czasu postępowano tak, jak

zostało wyżej opisane. Pomiary dla tej linii były przeprowadzone na cytometrze przepływowym BD™ LSR II.

3.5. Analiza reaktywnych form tlenu

Do eksperymentów, których celem było wyznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RTF, ang. *Reactive oxygen species (ROS)*), komórki linii HCT116 wysiewano w takich samych ilościach i inkubowano ze związkiem w takich samych czasach, jak w przypadku analizy cyklu komórkowego dla tej linii komórkowej. Po upływie założonego czasu inkubacji ze związkiem, bądź medium (dla komórek kontrolnych) - komórki trypsynizowano i wirowano również tak, jak opisano wcześniej. Następnie rozpipetowywano komórki w 300 µl medium hodowlanego i dodawano 10 µl dichlorofluoresceiny (DCF, Sigma) o końcowym stężeniu 30 µM. Kolejno komórki inkubowano w ciemności w 37°C przez 30 min. Po tym czasie zawiesinę wirowano przez 3 minuty w 4°C i przy 2500 rpm, usuwano supernatant i zawieszano komórki w 300 µl PBS. Przygotowane do pomiaru próbki przechowywane były na lodzie. Bezpośrednio przed pomiarem w cytometrze próbówki były wortexowane. Pomiar dokonywany był na cytometrze przepływowym BD FACSAria™ II (laser 488 nm, LP 503, BP filtr 530/30).

3.6. Analiza apoptozy (test z Aneksyną V)

Do eksperymentów, których celem była analiza apoptozy, komórki linii HCT116 wysiewano w takich samych ilościach i w takich samych czasach inkubacji traktowano związkiem, jak w przypadku analizy cyklu komórkowego dla tej linii komórkowej. Po upływie założonego czasu inkubacji ze związkiem, bądź medium (dla komórek kontrolnych) - komórki trypsynizowano i wirowano również tak, jak opisano wcześniej. Po odwirowaniu supernatant był usuwany, natomiast do peletki komórek dodawano 50 µL buforu do apoptozy oraz 2,5 µl aneksyny V (Annexin V binding, Sigma). Tak przygotowane roztwory były inkubowane w 37°C przez 30 min, po wymaganym czasie dodawano jeszcze 250 µl buforu do apoptozy oraz 10 µl jodku propidyny (100 µg/ml) (PI, Sigma). Przygotowane do pomiaru próbki przechowywane były na lodzie. Bezpośrednio przed pomiarem w cytometrze próbówki były wortexowane. Pomiar dokonywany był na cytometrze przepływowym BD FACSAria™ II.

3.7. Analiza zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym (TMRE)

Śmierć komórkowa prowadzi do zmian w potencjale mitochondrialnym, zmiany te można określić między innymi przy pomocy rodaminy [68]. Do eksperymentów, których celem była analiza zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym komórki linii HCT116 wysiewano w takich samych ilościach i w takich samych czasach inkubacji traktowano związkiem, jak w przypadku analizy cyklu komórkowego dla tej linii komórkowej. Po upływie założonego czasu inkubacji ze związkiem, bądź medium (dla komórek kontrolnych) - komórki trypsynizowano i wirowano również tak jak opisano wcześniej. Po tym czasie zawiesinę wirowano przez 3 minuty w 4°C i przy 2500 rpm, usuwano supernatant i zawieszano komórki w 300 µl medium hodowlanego z dodatkiem 1,5 µl estru tetraetylorodaminy (50 nM) (TMRE, Sigma). Tak przygotowane roztwory były inkubowane w 37°C przez 30 min. Po tym czasie komórki wirowano przez 3 minuty w 4°C i przy 2500 rpm, usuwano supernatant i zawieszano komórki w 300 µl PBS. Przygotowane do pomiaru próbki przechowywane były na lodzie. Bezpośrednio przed pomiarem w cytometrze próbki były wortexowane. Pomiar dokonywany był na cytometrze przepływowym BD FACSAria™ II (wzbudzenie: 547 nm, emisja: 585 nm).

3.8. Analiza zmian masy mitochondrialnej (NAO)

Do eksperymentów, których celem była analiza zmian masy mitochondrialnej komórki linii HCT116 wysiewano w takich samych ilościach i w takich samych czasach inkubacji traktowano związkiem, jak w przypadku analizy cyklu komórkowego dla tej linii komórkowej. Po upływie założonego czasu inkubacji ze związkiem, bądź medium (dla komórek kontrolnych) - komórki trypsynizowano i wirowano również tak, jak opisano wcześniej. Po tym czasie zawiesinę wirowano przez 3 minuty w 4°C i przy 2500 rpm, usuwano supernatant i zawieszano komórki w 300 µl medium hodowlanego z dodatkiem 3 µl NAO (100 nM) (NAO, Sigma). Tak przygotowane roztwory były inkubowane w 37°C przez 30 min. Po tym czasie komórki wirowano przez 3 minuty w 4°C i przy 2500 rpm, usuwano supernatant i zawieszano komórki w 300 µl PBS. Przygotowane do pomiaru próbki przechowywane były na lodzie.

Bezpośrednio przed pomiarem w cytometrze próbówki były wortexowane. Pomiar dokonywany był na cytometrze przepływowym BD FACSAria™ II (wzbudzenie: 489 nm, emisja: 525 nm, co odzwierciedla masę mitochondriów w komórce).

3.9. Analiza Western Blot

Metoda rozdziału poszczególnych białek - Western Blot pozwala analizować białka, które wchodzi w skład komórek. Dzięki temu możliwa jest analiza ekspresji białek aktywnych po podaniu czynnika toksycznego, co pozwala na określenie mechanizmów, które zachodzą w komórkach.

3.9.1. Przygotowanie lizatów komórkowych – izolacja białek

Do analizy metodą Western Blot komórki linii MCF7 wysiewane były w pożywce hodowlanej DMEM/F12 (+12% FBS) na szalki Petriego (o średnicy 3cm) (Nunc) w ilościach:

- 600 000 komórek/szalkę/1.5ml dla 3. oraz 6 godzin inkubacji
- 500 000 komórek/szalkę/1.5ml dla 12. oraz 24 godzin inkubacji
- 400 000 komórek/szalkę/1.5ml dla 48 godzin inkubacji.

Po 24h medium hodowlane, zastępowano związkiem Au14 w stężeniu 1 μ M, cisplatyną w stężeniu 20 μ M lub świeżym medium hodowlanym (+12% FBS) (grupa kontrolna). Po upływie wymaganego czasu inkubacji medium i związki były usuwane, komórki przepłukiwane dwukrotnie PBS i do każdej szalki dodawano 150 μ l buforu lizującego RIPA (ThermoFisher) z dodatkiem koktajli inhibitorów proteaz i fosfataz oraz 0,5 M EDTA. Lizowanie komórek odbywało się na kołysce laboratoryjnej, na lodzie przez 20 minut. Po tym czasie lizaty zostały zebrane do probówek eppendorfa, kolejno sonikowane (5 sek., na lodzie) oraz wirowane (10 000 rpm, 10 min, 4°C). Uzyskane lizaty białkowe do czasu dalszych analiz przechowywane były w -80°C.

3.9.2. Pomiar stężenia białka w lizatach komórkowych

Stężenie białka w przygotowanych lizatach oznaczane było za pomocą komercyjnego zestawu Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher), według protokołu producenta. Na płytce 96-dółkowej (Nunc) przygotowane zostały

roztwory służące do wyznaczenia krzywej wzorcowej, w której użytym standardem była surowicza albumina wołowa (BSA). Następnie przygotowane zostały próby badane w rozcieńczeniu 1:4, w trzech powtórzeniach każda. Do każdego dołka zostało dodane po 150 μ l świeżo przygotowanego roztworu roboczego „WR” (ang. working reagent). „WR” powstał poprzez zmieszanie odczynników A, B i C z zestawu do pomiaru stężenia białka w odpowiednich proporcjach: 25:24:1. Kolejnym krokiem była inkubacja w 37°C przez 1 godzinę. Po upływie zalecanego czasu przeprowadzony został pomiar absorbancji przy długości fali 562 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4 (BioTek). Stężenie białka w przygotowanych lizatach wyznaczono w oparciu o krzywą wzorcową, która została wykreślona na podstawie pomiaru absorbancji roztworów BSA w zakresie stężeń 0,2÷1,2 mg/ml.

3.9.3. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym

Następnym etapem analizy Western Blot był rozdział elektroforetyczny zdenaturowanych białek. W tym celu należało z lizatów przygotować próby o jednakowej zawartości białka (15 μ g) z dodatkiem buforu obciążającego Laemmli 4x (Biorad) wraz ze środkiem redukującym (2-merkaptetanol). Tak przygotowane próbki inkubowane były w 70°C na termobloku przez 10 min., po tym czasie były one wirowane i umieszczone na lodzie. Kolejnym krokiem było nałożenie badanych prób oraz markera wielkości (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard) na żel poliakrylamidowy gradientowy 4-15% (Biorad). Rozdział elektroforetyczny białek SDS-Page przeprowadzany był w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Biorad) w schłodzonym buforze 1x TGS (Tris-Glicyna-SDS), przy stałym napięciu 130 V przez około 1,5 godziny.

3.9.4. Transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową

Po elektroforezie białka zostały przeniesione na nitrocelulozową membranę o wielkości porów 0,2 μ m (Biorad). Transfer mokry w polu elektrycznym przeprowadzony był w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Biorad), w schłodzonym 1x buforze do transferu z dodatkiem metanolu, przy stałym natężeniu prądu 350 mA przez 2,5 godziny. Po zakończeniu elektrotransferu

membrana nitrocelulozowa była przez 1 godzinę blokowana w 5% roztworze odtuszczonego mleka (mleko i PBS zawierający 0,1% Tween-20 (Sigma)).

3.9.5. Inkubacja membrany z przeciwciałami

Kolejnym etapem była całonocna inkubacja membrany z specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (w 5% roztworze mleka w TPBS) na kołysce laboratoryjnej w 4°C. Kolejnego dnia membrany były 3-krotnie płukane po 5 min w TPBS, a następnie inkubowane przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP) (tabela 2).

Tabela 2. Przeciwciała użyte do detekcji białek w technice Western blot

Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie
PARP (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
pAKT (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
Chk1 (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
p53 (I-rzędowe)	mysie monoklonalne	1:200
Cyklina D (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
p21 (I-rzędowe)	mysie monoklonalne	1:1000
Kaspaza 8 (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
Kaspaza 3 (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
GAPDH (I-rzędowe)	królicze monoklonalne	1:1000
II-rzędowe (anty-królicze)	kozie, znakowane HRP	1:1000
II-rzędowe (anty-mysie)	końskie, znakowane HRP	1:1000

3.9.6. Detekcja białek

Po tym czasie inkubacji z przeciwciałami, membrany były ponownie płukane (3-krotnie po 5 min. w TPBS), a następnie dodano na membrany odczynnik chemiluminescencyjny, umożliwiający detekcję białek - SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher) i inkubowano w ciemności około 5 min. Ostatnim etapem było zobrazowanie sygnału

chemiluminescencyjnego przy użyciu trans iluminatora ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad) i oprogramowania Image Lab Ver. 4.1 (Biorad). Obrazy uzyskane w ten sposób były analizowane densytometrycznie w oprogramowaniu ImageJ. Poziomy ekspresji poszczególnych białek normalizowane były do prób kontrolnych oraz analizowane względem ekspresji białka użytego jako referencja – GAPDH. Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe (SD).

3.10. Lokalizacja związku w komórkach linii MCF7 za pomocą mikroskopii konfokalnej

Mikroskopia konfokalna jest odmianą mikroskopii świetlnej, dzięki której można uzyskiwać wysokiej jakości obrazy oraz rekonstruować je w trójwymiarze. Możliwe jest to dzięki konstrukcji mikroskopu różniącej się od tradycyjnego mikroskopu świetlnego, gdzie oświetlana jest cała próbka. W mikroskopii konfokalnej zastosowano przesłony, próbka skanowana jest w przekrojach optycznych, co skutkuje dobrym kontrastem i powstaniem wysokiej jakości obrazu [73].

Do określenia lokalizacji badanych związków w komórkach linii MCF7 komórki te wysiewano komórki linii MCF7 w ilości 300 000/1,5 ml w pożywce hodowlanej DMEM/F12 (+12% FBS) na szalki Petriego (o średnicy 3 cm). Po 24 godzinach medium hodowlane zastępowane było świeżym medium dla grupy kontrolnej, medium z 25 μ M związku Au5 lub Au14. Inkubacja ze związkami trwała 3 godziny. Po dwóch godzinach inkubacji na szalki dodano 300 μ L roztworu medium bez czerwieni fenolowej i barwnika specyficznego łączącego się z mitochondriami lub lizosomami w stężeniu roboczym – 300 nM. Bezpośrednio przed badaniem mikroskopowym płynna zawartość szalek została usuwana, szalki przepłukiwane były dwukrotnie PBS, a następnie w PBS następował pomiar fluorescencji komórek ze związkami Au5 lub Au14 oraz komórek z Au5 z barwnikiem, Au14 z barwnikiem, komórek MCF z barwnikiem specyficznym łączącym się z mitochondriami (mitotracker) lub barwnikiem specyficznym łączącym się z lizosomami (lysotracker) przy odpowiednich długościach fal promieniowania wzbudzającego i emisyjnego:

- Au5: $\lambda_{\text{ex.}}$ 365nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 449nm

- Au14: $\lambda_{\text{ex.}}$ 367nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 449nm
- mitotracker RED: $\lambda_{\text{ex.}}$ 579nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 599nm
- lysotracker RED: $\lambda_{\text{ex.}}$ 577nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 590nm

Zdjęcia zostały wykonane na mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM700 (dla kompleksu Au14) lub Zeiss LSM 800 (dla kompleksu Au5), a następnie zanalizowane w oprogramowaniu marki Zeiss – ZEN 2.1 (black).

3.11. Analiza statystyczna

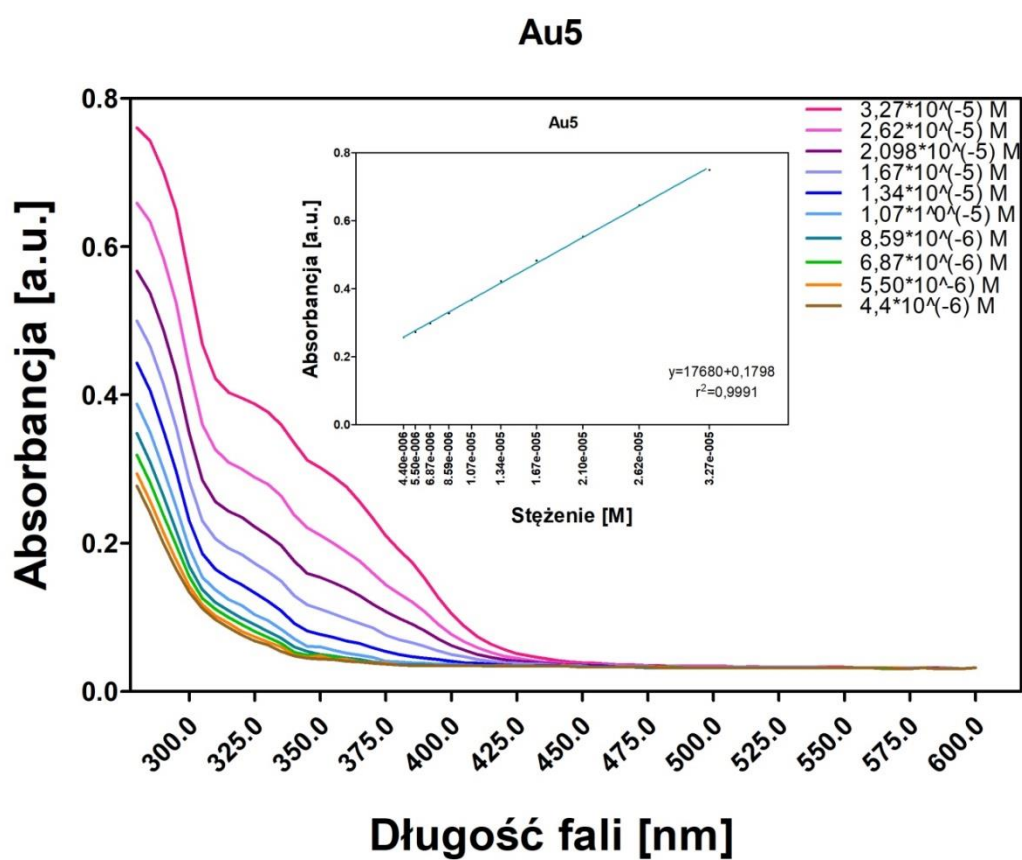
Każdy z opisanych eksperymentów powtarzany był przynajmniej 3 razy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD). Dla eksperymentów z cytotoksyczności analizę wyników przeprowadzono przy pomocy oprogramowania GraphPad Prism 5.0, dla pomiarów wykonywanych przy użyciu cytometrii przepływowej analiza odbywała się w oprogramowaniu FlowJo, dla analizy białek przy pomocy Western Blot w oprogramowaniu Image Lab Ver. 4.1 oraz ImageJ. Natomiast pomiary spektrofotometryczne opracowywane były przy pomocy oprogramowania: UV-Solution oraz FL-Solution.

V. Analiza i dyskusja wyników

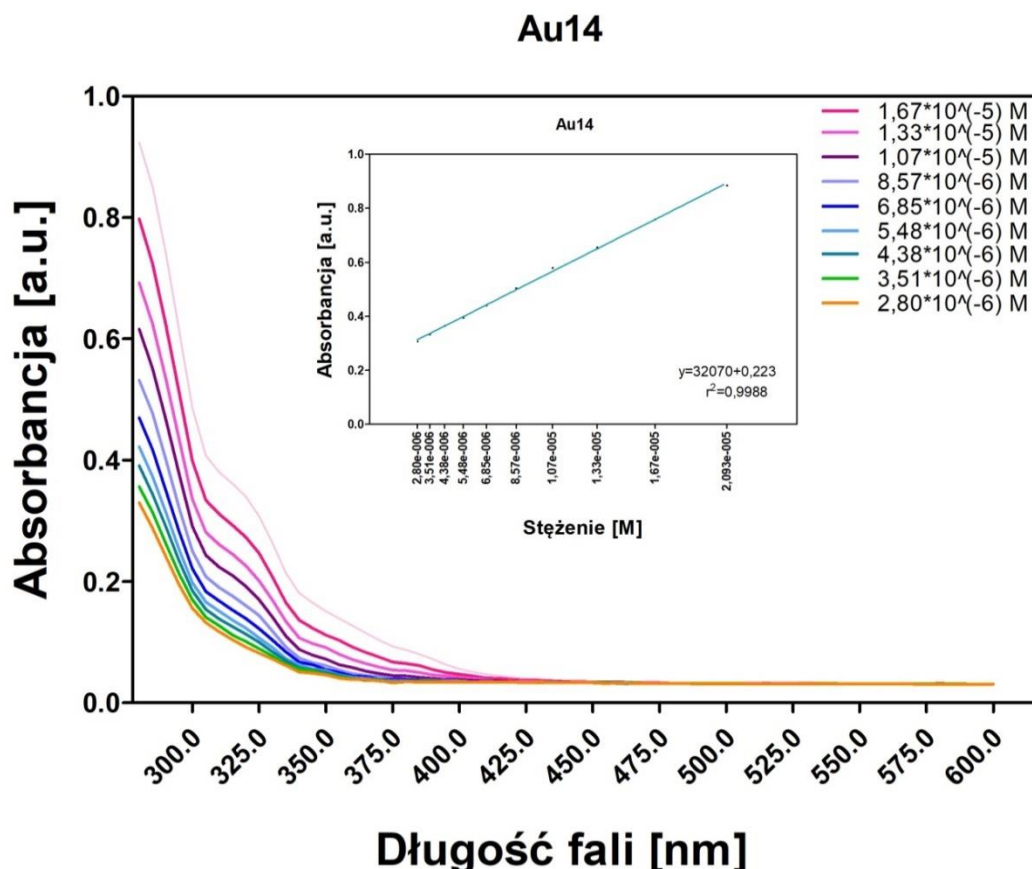
1. Badania spektrofotometryczne

1.1. Widma absorpcyjne

Badania spektrofotometryczne zostały wykonane na serii roztworów związków złota – Au5 oraz Au14 w celu określenia ich właściwości spektralnych.



Wykres 1. Kompleks Au5 –widma absorpcji, seria roztworów

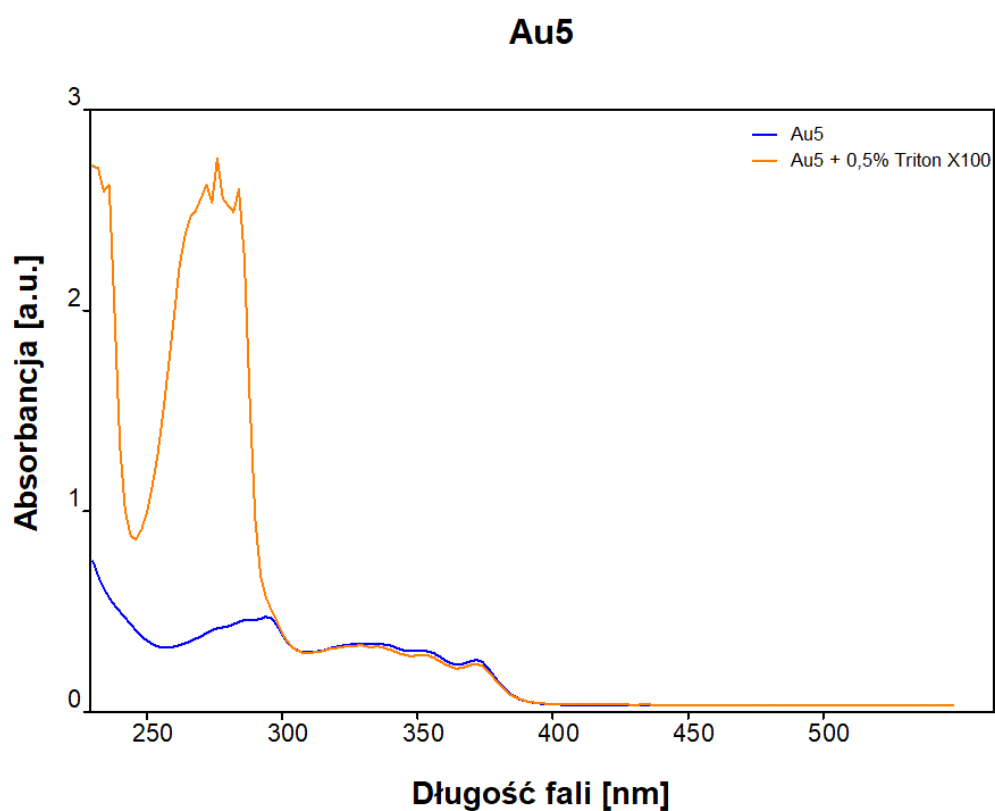


Wykres 2. Kompleks Au14 –widma absorpcji, seria stężeń

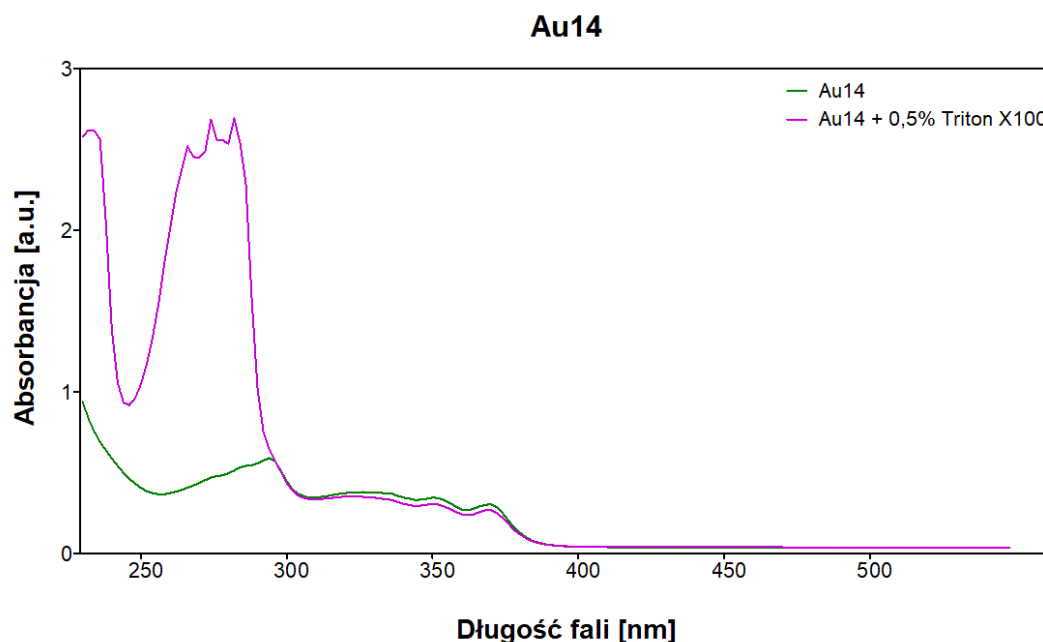
Badane związki posiadają widmo składające się z jednego intensywnego pasma oraz trzech mniej intensywnych. Maksimum absorpcji dla badanych związków występuje przy długości fali 283 nm, biorąc pod uwagę odcięcie wykresu, ze względu na użyty rozpuszczalnik – DMSO. Na wykresie obserwuje się kilka pików o charakterze gaussowskim. Można również zauważyć, że występujące pasma nakładają się na siebie.

Ważnym parametrem leków używanych w terapiach przeciwnowotworowych jest to, aby potencjalny lek nie ulegał agregacji w środowisku wodnym [74]. W celu sprawdzenia, czy analizowane kompleksy złota ulegają agregacji, wykreślone zostały krzywe zależności absorbancji od stężenia tych związków. Zależności przedstawiono na wykresach 1 i 2. Wraz ze spadkiem stężenia badanej pochodnej, zauważalny jest spadek absorbancji. Związki Au5 (wykres 1), jak i Au14 (wykres

2) charakteryzują się liniową zależnością absorbancji od stężenia z dobrym dopasowaniem r^2 na poziomie 0,9991 dla pierwszej pochodnej oraz $r^2=0,9988$ dla drugiej, co świadczy o prawidłowym wykonaniu rozcieńczeń roztworów. Na podstawie tego wyniku, nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, czy związki nie ulegały agregacji, gdyż występujące w roztworach agregaty mogły być systematycznie „rozcieńczane”. W celu sprawdzenia takiej możliwości przeprowadzone zostały pomiary widm absorpcji dla Au5 oraz Au14 w rozpuszczalniku (PBS) oraz z dodatkiem surfaktantu (Triton X-100), którego obecność zwiększa solubilizację związków w roztworach (wykres 3 i 4).



Wykres 3. Widmo absorpcyjne związku Au5 rozpuszczonego w buforze oraz z dodatkiem Tritonu X-100



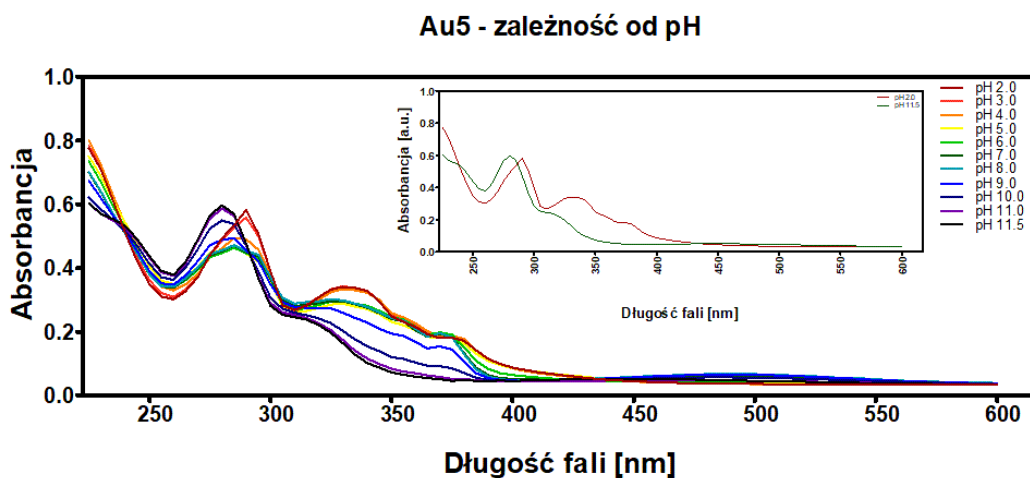
Wykres 4. Widmo absorpcyjne związku Au14 rozpuszczonego w buforze oraz z dodatkiem Tritonu X-100

Zarejestrowane widma pokazują, że po dodaniu surfaktantu rośnie intensywność absorbancji w zakresie spektralnym 225-290 nm, natomiast widmo powyżej tej długości dla obydwóch związków pozostaje bez zmian. Świadczyć to może o agregacji związku w środowisku wodnym, co niestety może mieć wpływ na ograniczenie zastosowania tych związków w terapii przeciwnowotworowej. Rozwiązaniem tego problemu może być zamknięcie badanych kompleksów złota (III) w nanonośnikach takich jak na przykład liposomy, co ograniczy kontakt potencjalnego leku ze środowiskiem wodnym. Dodatkowym atutem użycia liposomów jest możliwość ukierunkowanego dostarczenia leku do obrębu guza nowotworowego, dzięki odpowiedniemu zaprojektowaniu nanonośnika. Wiąże się to przede wszystkim ze zmniejszeniem skutków ubocznych chemioterapii i polepszeniem indeksu terapeutycznego leku [75]. Badania chemioterapeutyków zamkniętych w nośnikach liposomowych są prowadzone właśnie pod tym kątem. Dane literaturowe pokazują, że dokсорubicyna (DOX) po zamknięciu w liposomach charakteryzuje się zmniejszoną kardiotoxycznością, która to jest jednym z najpoważniejszych skutków ubocznych jej stosowania [76][77][78].

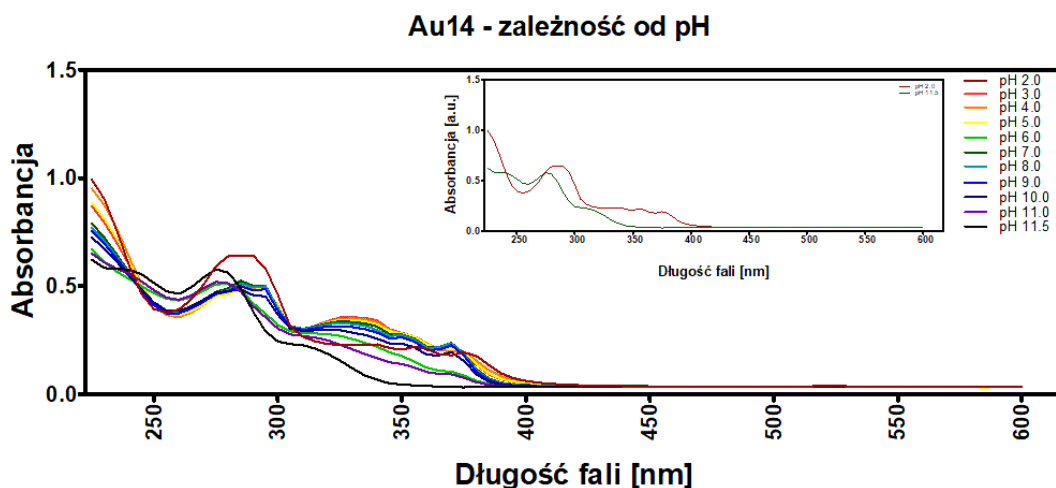
1.1. Zależność absorpcji od pH roztworu

W badaniu spektrofotometrycznym zależności widm absorpcji od pH roztworów zauważalna jest delikatna zmiana kształtu widm. Dla związku Au5 dla niskich pH (2.0, 3.0) maksimum położenia pasma absorpcji jest przesunięte w stronę dłuższych fal, w stosunku do wyjściowego roztworu związku w DMSO z PBS i wynosi 290 nm. Dla kolejnego zakresu pH (4.0-9.0) maksimum absorpcji występuje przy 285 nm, natomiast dla wysokich, zasadowych pH (10-11.5) przesunięte jest w lewo i wynosi 280 nm (wykres 5).

Z kolei dla związku Au14 widma w zakresie pH 3.0-10.0 mają maksimum w tym samym miejscu, tzn. 285 nm, natomiast odchylenia widoczne są przy skrajnych wartościach pH, dla pH=2.0 jest przesunięte w stronę dłuższych fal na 290 nm, z kolei dla najwyższych wartości pH 11.0-11.5 widoczne jest odchylenie w stronę fal krótszych, dla tych wartości pH maksimum absorpcji wynosi 275 nm (wykres 6).



Wykres 5. Au5 - zależność absorpcji od pH roztworu

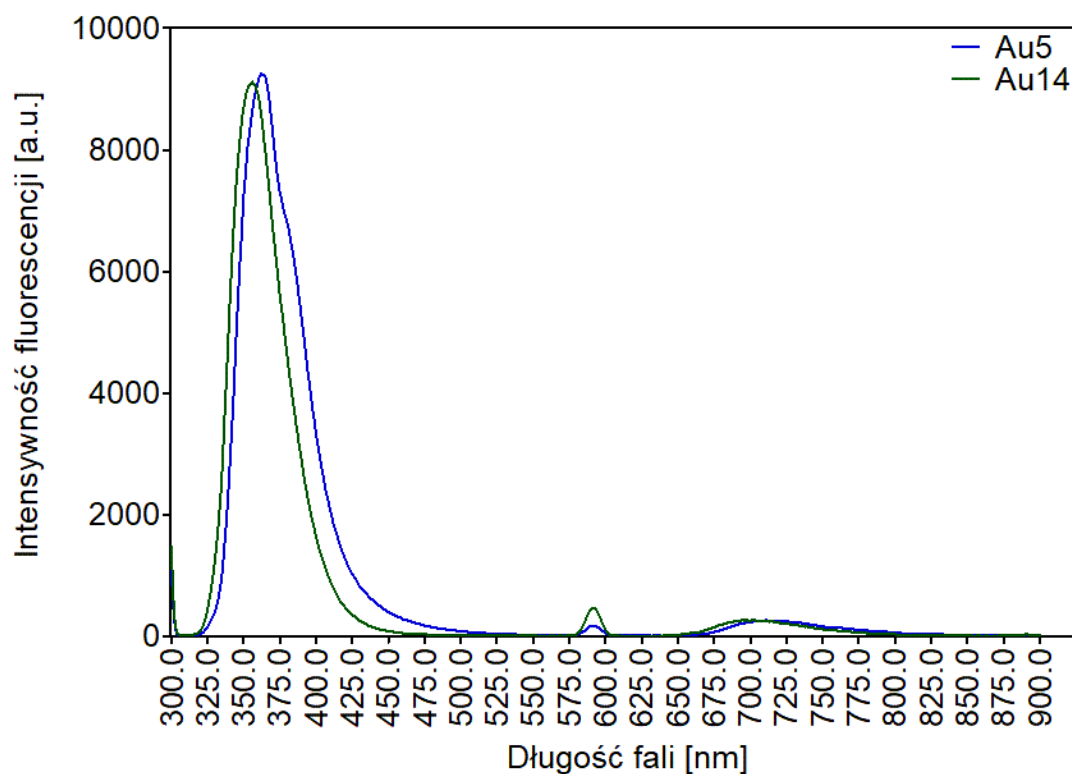


Wykres 6. Au14 - zależność absorpcji od pH roztworu

Różnica pomiędzy widmem dla roztworu o pH 2.0, a roztworem o pH najwyższym – 11.5 w przypadku obydwóch kompleksów złota (III) jest niewielka. Dla związku Au5 intensywność absorpcji jest na zbliżonym poziomie, występuje jednakże przesunięcie w kierunku krótszych fal dla roztworu zasadowego (wykres 5 i 6). Na wykresie tym obserwowany jest także dodatkowy pik dla pH 2.0 przy długości fali 330 nm dla Au5 i przy 360-380 nm dla Au14, co może świadczyć o niestabilności kompleksu podczas zmiany pH, bądź o jego agregacji.

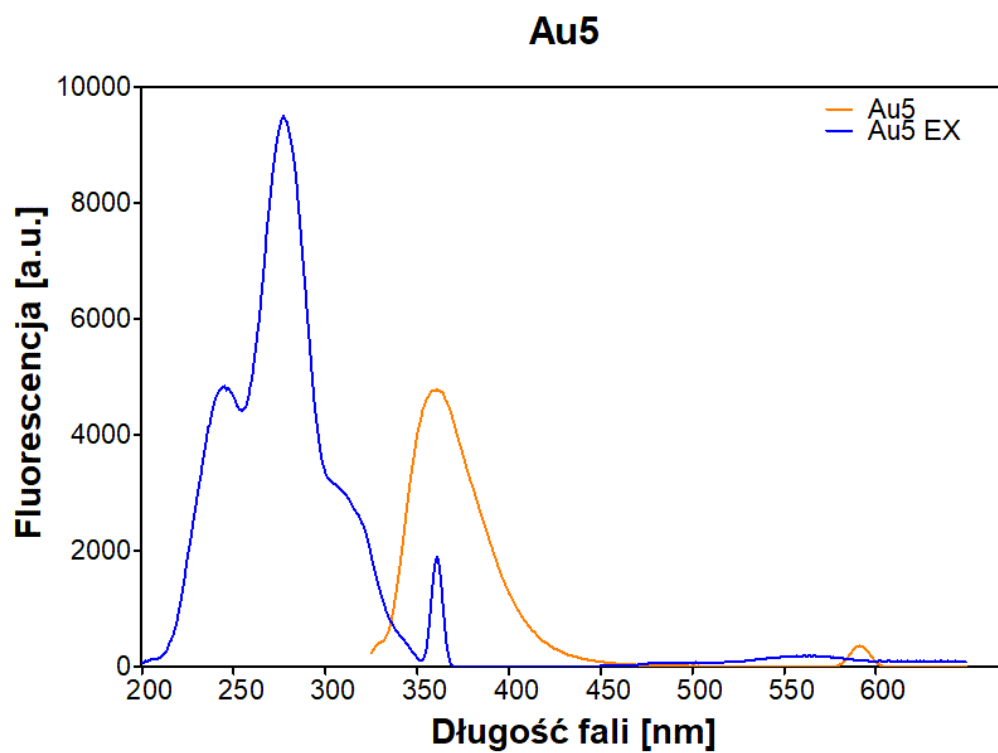
1.2. Widma emisyjne

Widma fluorescencyjne wykonane dla obydwu badanych pochodnych charakteryzują się bliskim położeniem maksimum pików emisji – 357 nm dla Au5 i 355 nm dla Au14 przy wzbudzeniu tą samą długością fali – 283 nm (maksimum położenia pików absorpcji dla obydwóch badanych związków). Obydwa widma mają podobny kształt, różnica widoczna jest w intensywności fluorescencji oraz położeniu maksimum pików emisji (wykres 7).

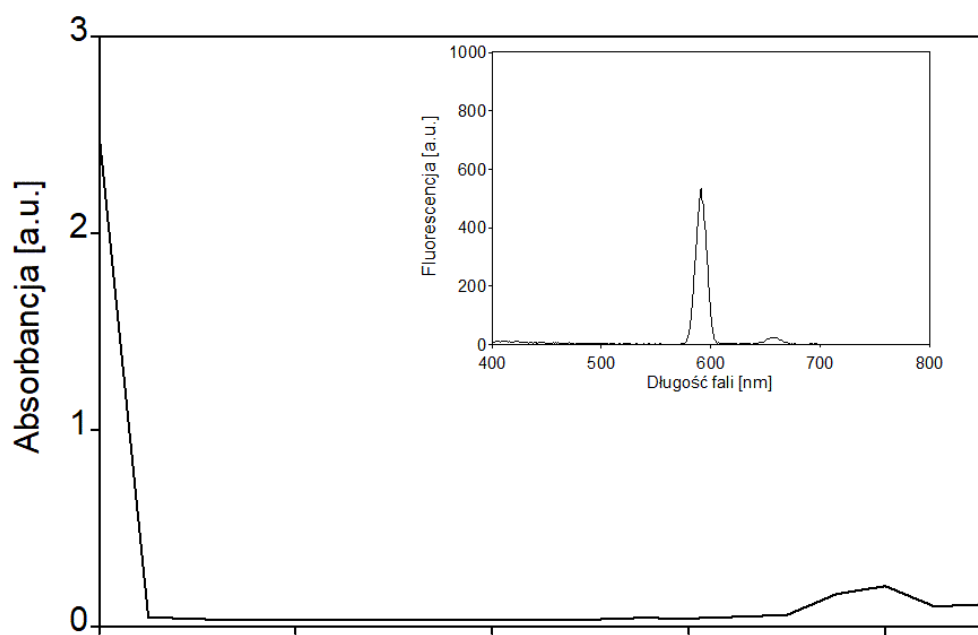


Wykres 7. Au5, Au14 - widma fluorescencji przy wzbudzeniu 283nm

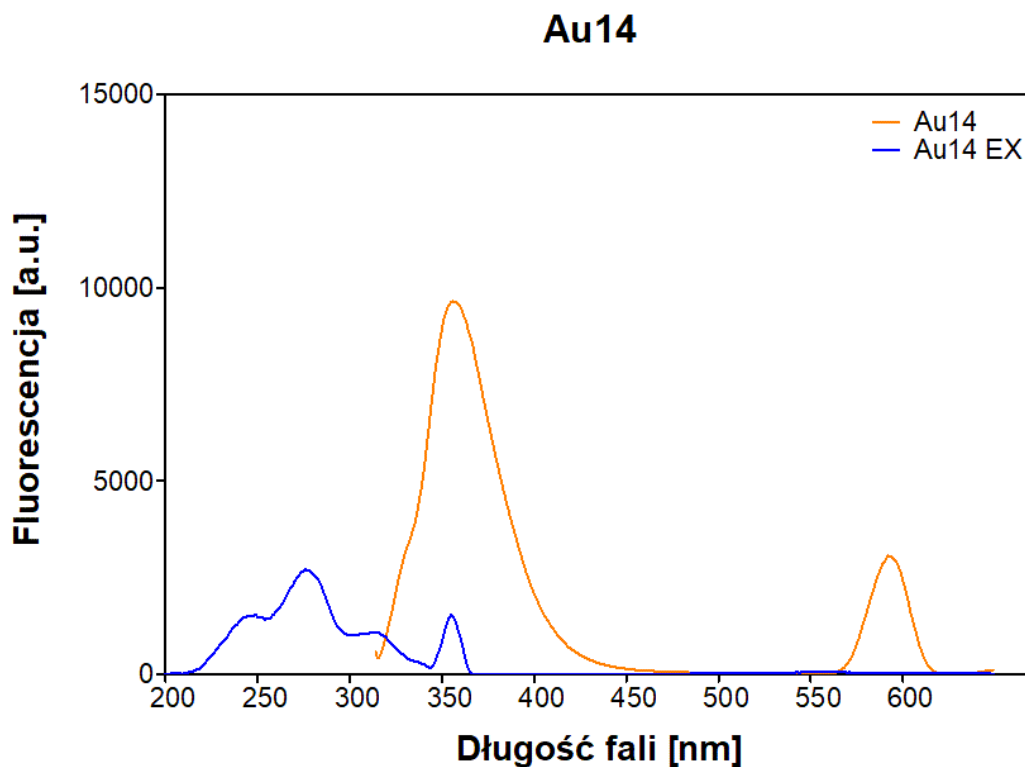
Związek Au5 charakteryzuje się niewiele intensywniejszą fluorescencją niż Au14. Maksimum fluorescencji dla tego kompleksu Au5 jest przesunięte w stronę dłuższych fal i wynosi 363 nm, natomiast dla Au14 przyjmuje wartość 356 nm. Na wykresie widoczne są również dwa piki o zdecydowanie mniejszej intensywności fluorescencji, występujące przy długościach fal: 590 nm oraz 700 nm, pochodzące od użytego w badaniach rozpuszczalnika, a więc mieszaniny DMSO z PBSem (wykres 8).



Wykres 9. Widmo ekscytacyjne oraz emisyjne dla Au5



Wykres 8. Widma absorpcyjne oraz fluorescencyjne użytego rozpuszczalnika (DMSO w PBS)



Wykres 10. Widmo ekscytacyjne oraz emisyjne dla Au14

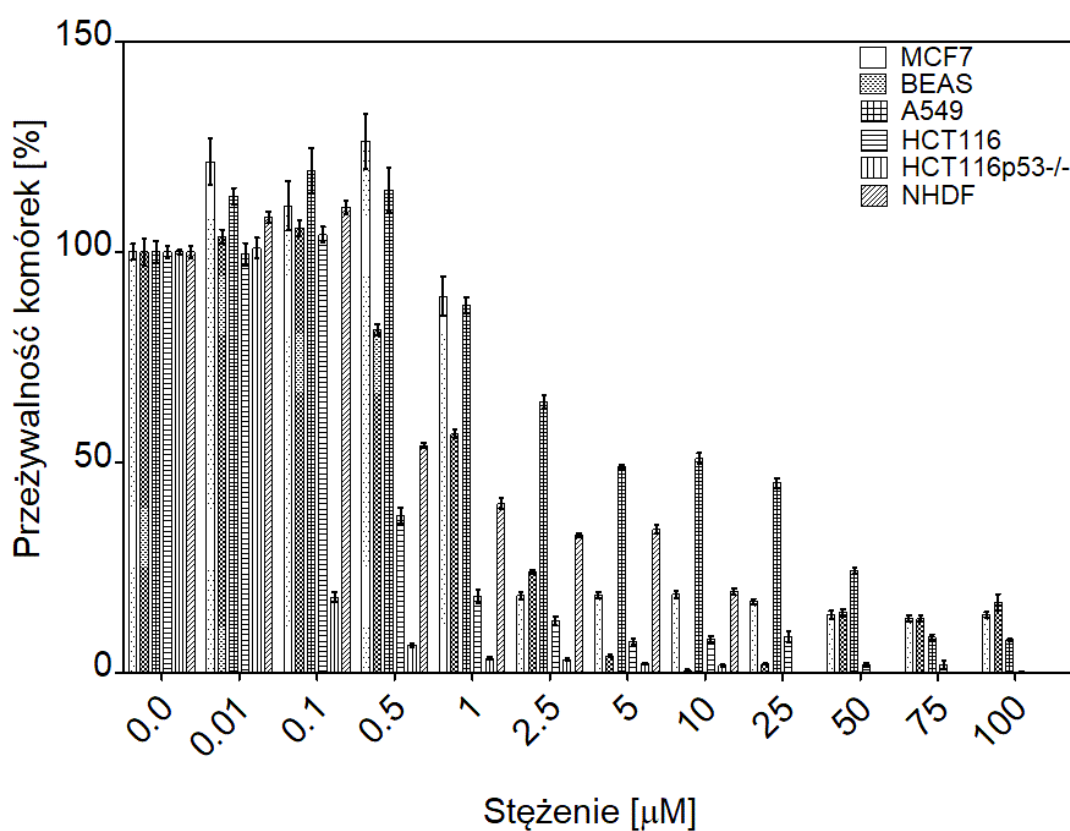
Z otrzymanych danych oraz widm obliczone zostało przesunięcia Stokesa. Wielkość tego parametru określa straty energii pomiędzy wzbudzeniem, a fluorescencją cząsteczek w roztworze. Duże wartości przesunięcia Stokesa mogą świadczyć o oddziaływaniu cząsteczek badanych kompleksów z innymi substancjami [79]. Przesunięcie Stokesa jest różnicą pomiędzy położeniem maksimum absorpcji ostatniego pasma, a maksimum emisji. Dla związku Au5 wynosi ono 9 nm, a dla Au14 – 14 nm. Uzyskane wartości wskazują, że straty energii pomiędzy wzbudzeniem, a emisją cząsteczek są małe, co oznacza, że struktura kompleksów złota w stanie wzbudzonym, jest taka sama, jak w stanie podstawowym [80].

2. Cytotoksyczność

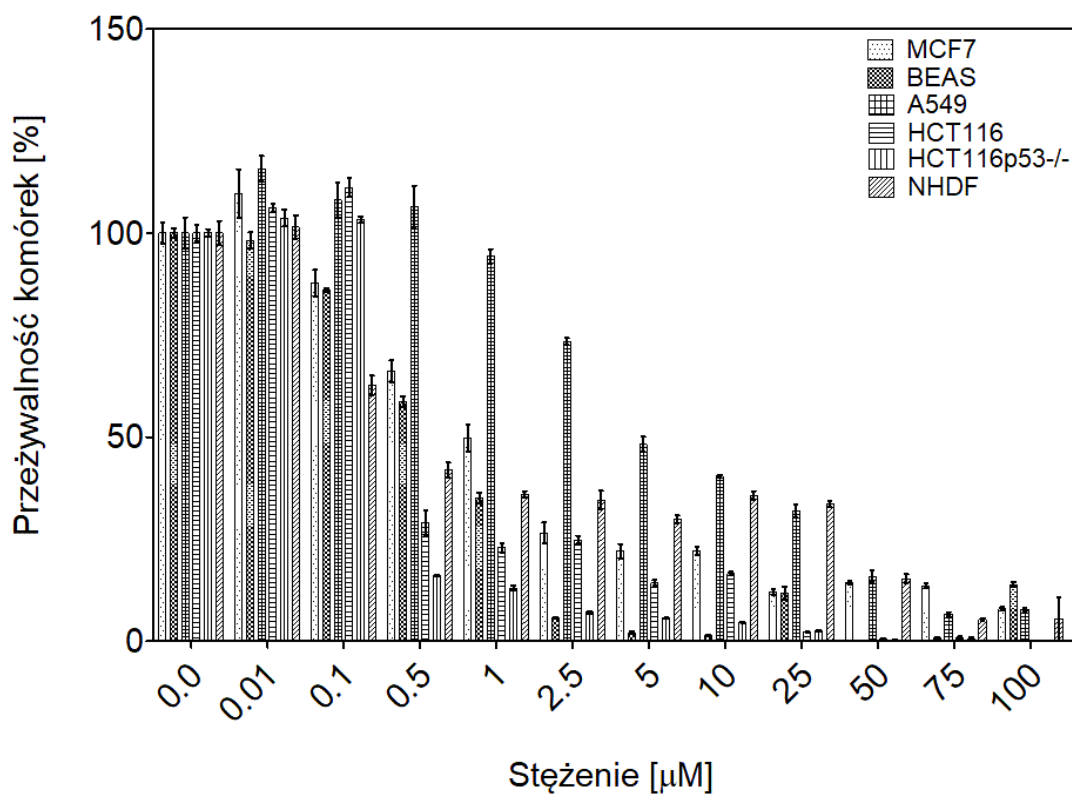
2.1. MTS

Test MTS został przeprowadzony na czterech nowotworowych liniach komórkowych oraz dwóch zdrowych. Testowane były związki Au5, Au14, ligand terpirydynowy Au5, ligand terpirydynowy Au14, rdzeń badanych związków (bez

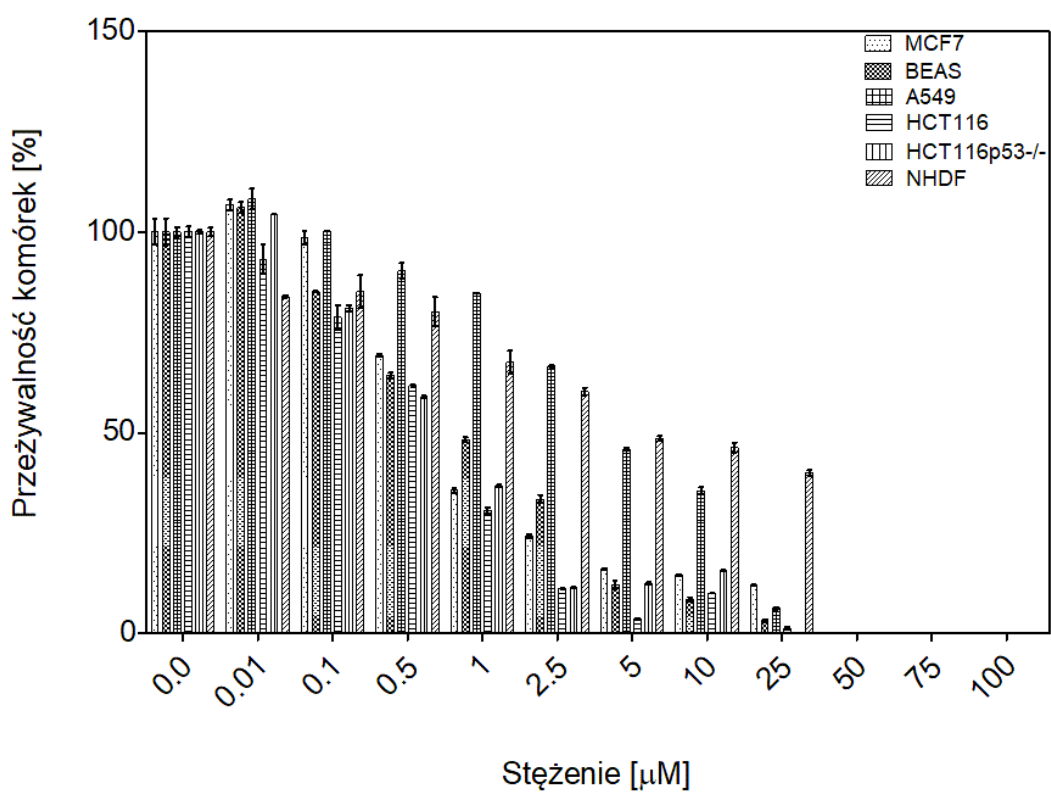
ligandów) oraz związek referencyjny – cisplatyna. Największa cytotoksyczność obserwowana jest dla linii komórkowych raka jelita grubego oraz raka jelita grubego z delecją genu p53 i wynosi odpowiednio: dla związku Au5 – 0,48 μM oraz 0,23 μM , natomiast dla związku Au14 – 0,33 μM oraz 0,27 μM . Najmniejszą z kolei cytotoksycznością, jeśli chodzi o kompleksy wykazuje się linia nowotworowa raka płuc – A549 i wynosi ponad 4 μM dla obydwu badanych kompleksów.



Wykres 11. Działanie związku Au5 na linie komórkowe [test MTS]



Wykres 12. Działanie związku Au14 na linie komórkowe [test MTS]



Wykres 13. Działanie związku Au ref na linie komórkowe [test MTS]

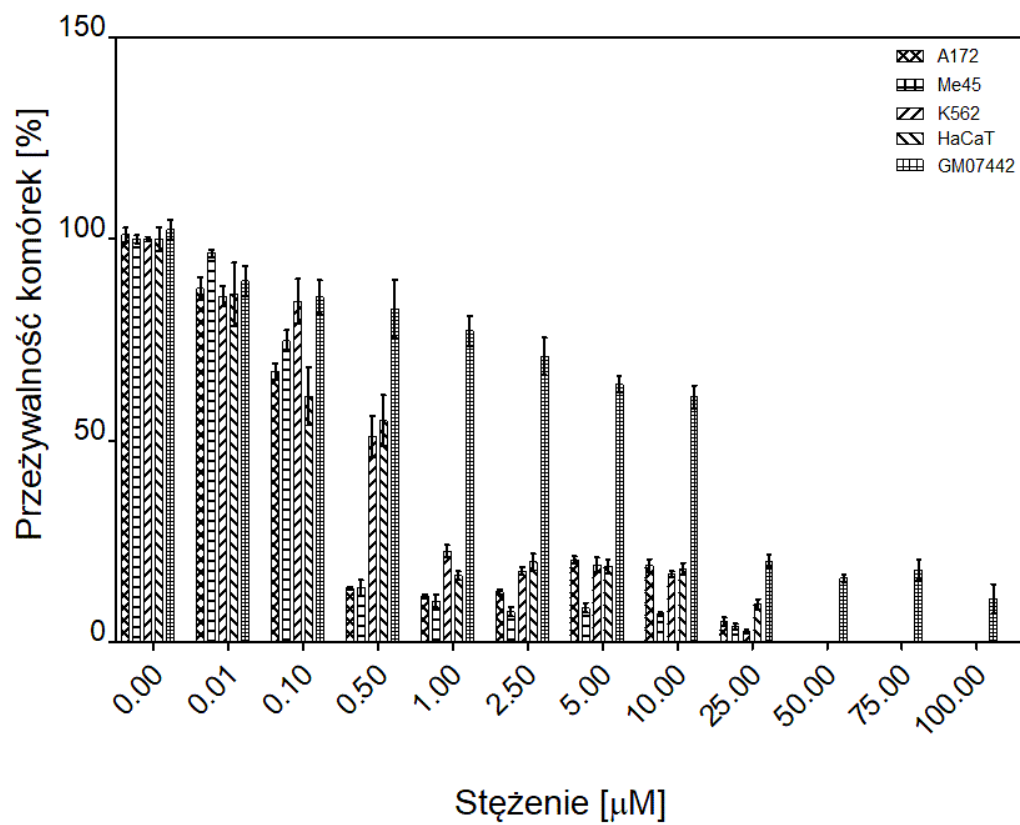
Tabela 3. Cytotoksyczność badanych związków i związku referencyjnego na liniach komórkowych [test MTS] [\pm SD]

Linia komórkowa →	HCT116	HCT116p53 ^{-/-}	A549	MCF7	NHDF	BEAS
Związek ↓						
Au5 [μ M]	0,48 \pm 0,57	0,23 \pm 0,20	4,65 \pm 3,07	2,30 \pm 0,86	0,93 \pm 1,01	2,71 \pm 2,02
Au14 [μ M]	0,33 \pm 0,14	0,27 \pm 0,12	4,41 \pm 2,50	0,69 \pm 0,11	1,09 \pm 0,43	0,52 \pm 0,06
4'-R ¹ -terpy [μ M]	1,12 \pm 0,34	0,62 \pm 0,15	5,07 \pm 1,36	0,41 \pm 0,09	24,15 \pm 13,39	0,36 \pm 0,10
4'-R ² -terpy [μ M]	0,85 \pm 0,45	0,38 \pm 0,13	1,33 \pm 0,78	0,28 \pm 0,08	22,06 \pm 11,34	0,43 \pm 0,15
[AuCl(terpy)](PF ₆) ₂	0,63 \pm 0,20	0,51 \pm 0,21	5,66 \pm 2,12	0,61 \pm 0,27	3,95 \pm 1,16	0,95 \pm 0,19
Cisplatyna [μ M]	20,30 \pm 2,80	31,99 \pm 5,82	12,82 \pm 0,99	14,99 \pm 2,09	12,31 \pm 1,51	12,46 \pm 1,15

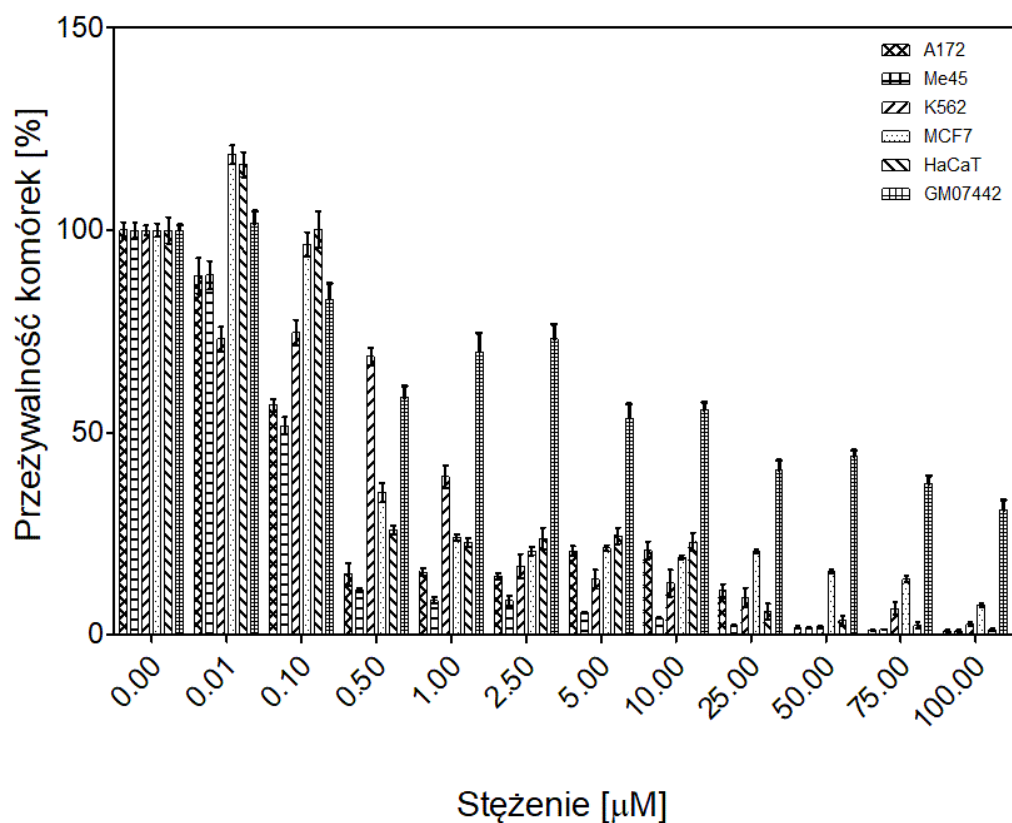
2.2. Cell-Titer Glo®

Drugi etap cytotoksyczności związków, badany czulszym testem od testu MTS wykazał następujące wyniki. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych wyników, bardziej wrażliwe na działanie badanych związków złota okazały się nowotworowe linie komórkowe. Cytotoksyczność dla linii MCF7, A172 oraz Me45 określona została na podobnym poziomie ($0,09 \pm 0,19 \mu\text{M}$). Najmniejszą wrażliwością wśród linii nowotworowych wykazała się białaczka (K562), gdzie IC₅₀ zostało określone na poziomie ok. $0,5 \mu\text{M}$ dla badanych kompleksów. Jeśli natomiast chodzi o linie komórkowe normalne – keranocyty (HaCaT), czyli komórki pochodzące z warstwy podstawnej naskórka są bardziej czułe na działanie zarówno związku Au5, jak i Au14 niż komórki linii GM07442.

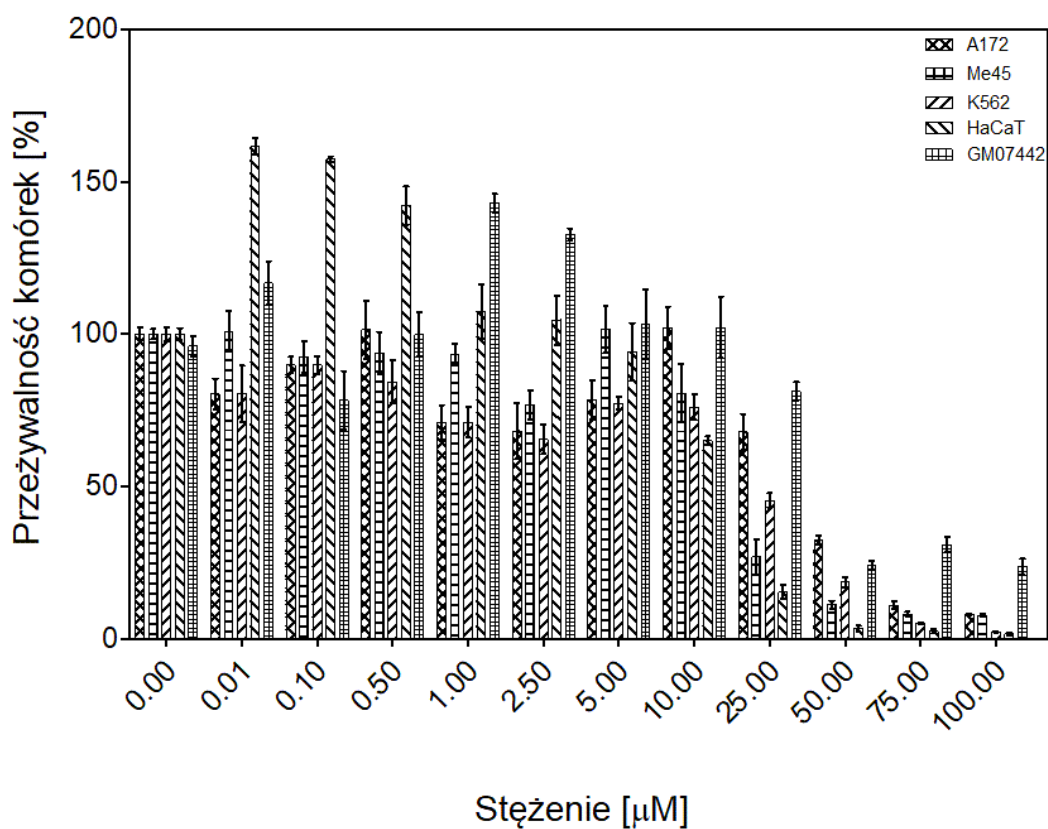
Za pomocą testu Cell-Titer Glo® potwierdzona została także dużo mniejsza aktywność związku referencyjnego – cisplatyny na badane linie komórkowe, w porównaniu do działania kompleksów złota.



Wykres 14. Działanie związku Au5 na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®]



Wykres 15. Działanie związku Au14 na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®]



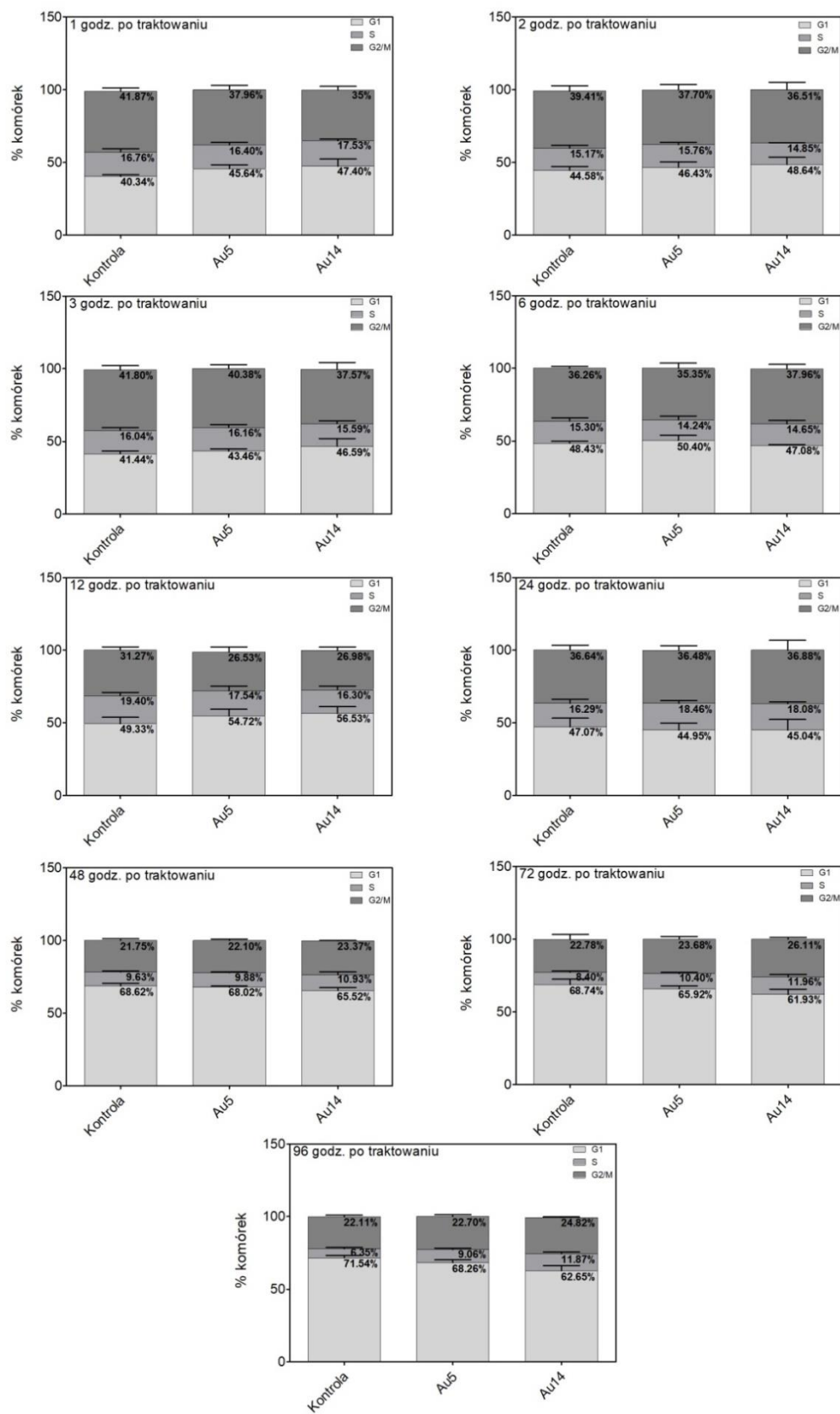
Wykres 16. Działanie cisplatyny na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®]

Tabela 4. Cytotoksyczność badanych związków i związku referencyjnego na liniach komórkowych [test Cell-Titer Glo®] [±SD]

Linia komórkowa →	A172	Me45	K562	MCF7	HaCaT	GM07442
Związek ↓						
Au5 [μM]	0,14 ±0,06	0,19 ±0,10	0,43 ±0,07	-	0,25 ±0,05	8,01 ±0,06
Au14 [μM]	0,13 ±0,05	0,094 ±0,04	0,51 ±0,05	0,19 ±0,04	0,54 ±0,10	13,48 ±0,02
Cisplatyna [μM]	34,66 ±0,53	17,65 ±0,27	12,93 ±0,12	-	13,09 ±1,03	40,73 ±0,08

3. Analiza cyklu komórkowego

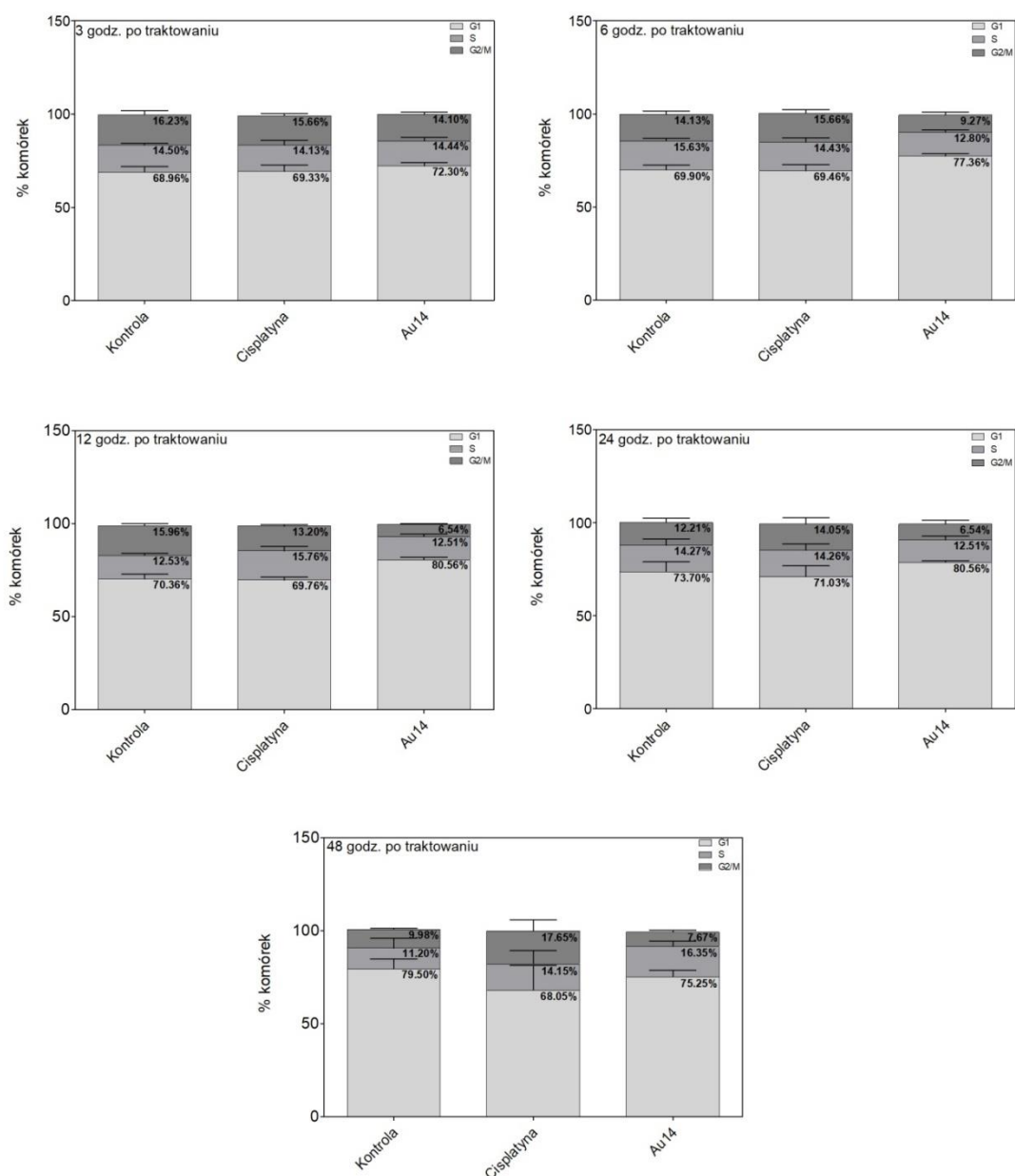
Analiza cyklu komórkowego daje informacje na temat działania zastosowanych związków chemicznych. Z wyników tego badania można określić czy badane potencjalne leki mają wpływ na kinetykę cyklu komórkowego, czy prowadzą co uszkodzenia materiału genetycznego, zatrzymania cyklu komórkowego, zahamowania wzrostu komórkowego, uszkodzenia i zapoczątkowania mechanizmów naprawy. Odpowiedź komórkowa na zadany bodziec jest też różna w zależności od fazy cyklu, w którym komórki się znajdują. Wszystkie odpowiedzi na te pytania daje analiza cyklu komórkowego [81].



Wykres 17. Cykl komórkowy po traktowaniu związkami Au5 lub Au14 na komórkach linii HCT116

Analiza cyklu komórkowego linii komórkowej HCT116 poddanej działaniu związków Au5 lub Au14 wykazała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. W porównaniu do grupy kontrolnej (nieotraktowanej żadnym ze związków), komórki traktowane odpowiadają inhibicją w fazie G1 widoczną już po 12 godzinach od podania kompleksów (wykres 17). Procent komórek zatrzymanych w tej fazie cyklu komórkowego jest wyższy po traktowaniu związkiem Au14. Obserwowane są zmiany w ilości populacji komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, w której znajdują się komórki z uszkodzoną błoną komórkową. Kierowane są one na szlaki naprawy/odbudowy komórki, bądź na drogę śmierci komórkowej.

Obserwowany jest wyższy procent komórek w tej fazie w porównaniu do komórek kontrolnych w pierwszych 12 godzinach od podania na komórki związków Au5 lub Au14. Może być to związane z akumulacją uszkodzeń komórkowych. Po 48 godzinach widoczny jest wyraźny wzrost komórek traktowanych w fazie G1 w porównaniu do komórek kontrolnych, co może sugerować aktywację procesów adaptacyjnych komórek traktowanych do toksycznego środowiska, w którym się znajdują.



Wykres 18. Cykl komórkowy po traktowaniu związkiem Au14 lub cisplatyną na komórkach linii MCF7

Podobne wnioski jak przy wynikach analizy cyklu komórkowego dla linii HCT116, wynikają z interpretacji wyników dla linii MCF7. Na wykresie przedstawione są wyniki dla poszczególnych godzin inkubacji komórek raka piersi z kompleksem złota Au14, bądź ze związkiem referencyjnym – cisplatyną. Pierwsze różnice w proporcji komórek raka piersi w poszczególnych fazach cyklu są zauważalne już po 6 godzinach traktowania. Dla komórek inkubowanych z kompleksem złota widoczny jest wzrost komórek w fazie cyklu G1 (77,36%)

w porównaniu do komórek traktowanych cisplatyną i komórek kontrolnych. Tendencja ta się utrzymuje. Z kolei dla związku referencyjnego widoczną zmianę obserwuje się po 24 godzinach inkubacji, jest to wzrost procenta komórek występujących w fazie G2/M, co jest zgodne z literaturą [82].

Zmiany w cyklu komórkowym są odpowiedzią na działanie czynników toksycznych. Reakcją komórki na uszkodzenie DNA pod wpływem badanych związków jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Występuje kilka punktów kontrolnych cyklu komórkowego, których zadaniem jest ochrona przed podziałem komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym. W punkcie kontrolnym G1, gdy komórka ma uszkodzony materiał genetyczny mogą zostać uruchomione systemy naprawy DNA lub może nastąpić aktywacja kaskady kaspaz, co prowadzi do śmierci komórkowej poprzez apoptozę [83][84]. Zatrzymanie cyklu w fazie G1 świadczy o antyproliferacyjnych właściwościach badanych związków.

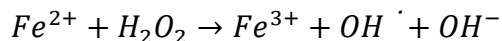
4. Analiza reaktywnych form tlenu na linii komórkowej HCT116

Reaktywne formy tlenu (RFT) są ważnymi elementami prawidłowej gospodarki organizmu/komórki. RTF prowadzą poprzez proces utleniania np. białek czy DNA do powstania toksycznych produktów, które mogą mieć niszczący wpływ na komórki – uszkodzają błony komórkowe lub mogą aktywować ścieżki śmierci komórkowej [85]. W warunkach homeostazy pełnią w komórce role regulatorowe, np.: mają wpływ na przebieg procesu starzenia, czy śmierci komórkowej [86]. Do RTF zaliczają się:

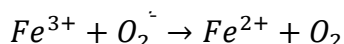
- anion ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -}$
- nadtlenuk wodoru H_2O_2
- rodnik hydroksylowy $\cdot OH$
- tlen singletowy 1O_2 [87].

Mogą powstawać pod wpływem: wysokiego/obniżonego ciśnienia tlenu, związków chemicznych, promieniowania, procesów i zaburzeń metabolicznych, stanów zapalnych, przewlekłych chorób [87], nieodpowiedniej diety, paleniem

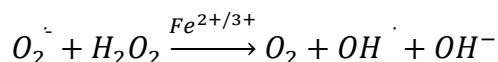
papierosów, spożywaniem alkoholu [86]. Powstawanie wolnych rodników opisują reakcje Fentona i Habera-Weissa:



Reakcja Fentona (powyżej) obrazuje powstanie rodnika hydroksylowego w obecności jonów metali przejściowych. Metal, który zostaje utleniony katalizuje. W późniejszym czasie może zostać zredukowany:



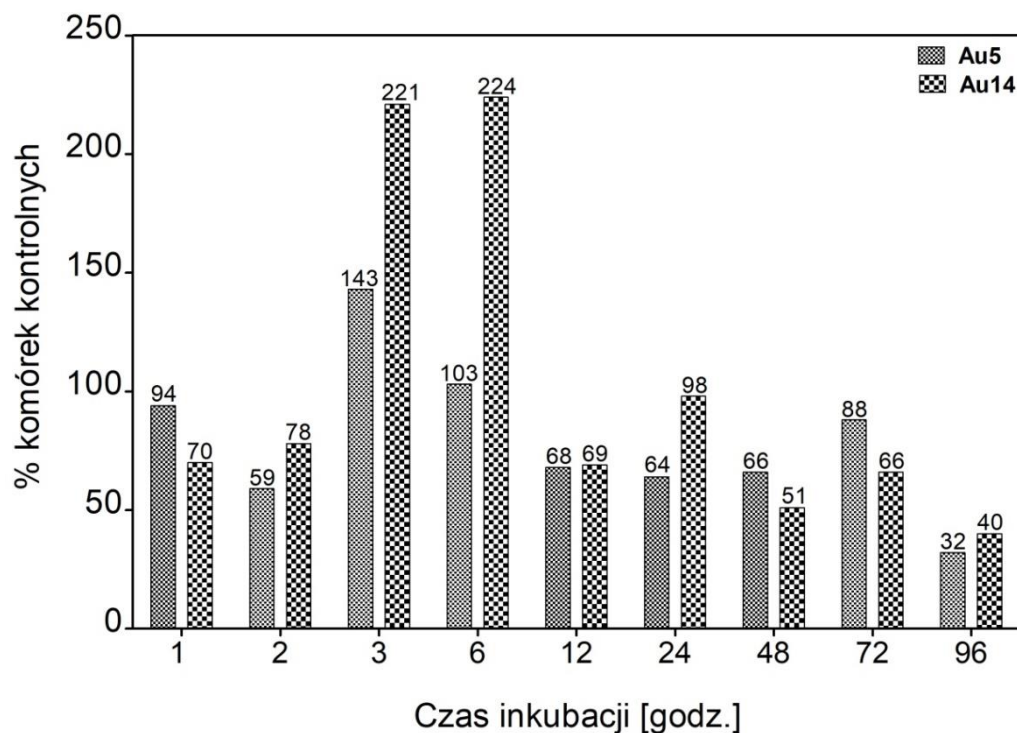
Obie reakcje mogą zostać zobrazowane za pomocą reakcji Habera-Weissa:



Obecność RTF powoduje między innymi: inaktywację enzymów, białek transportowych, pęknięcia nici DNA, uszkodzenie zasad DNA, uszkodzenie chromosomów, zmiany morfologii komórek, powstawanie mutacji, transformację nowotworową komórek [87].

Wykres 19 reprezentuje wyniki otrzymane dla analizy poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach linii HCT116 po traktowaniu badanymi kompleksami złota (Au5 lub Au14) w różnych punktach czasowych (1., 2, 3., 6, 12, 24, 48, 72 oraz 96 godz.). Wyniki wskazują na silną produkcję RTF, zarówno dla jednego, jak i drugiego związku po 3 i 6 godzinach inkubacji, przy czym dla związku Au14 produkcja RTF jest 80÷120% wyższa.

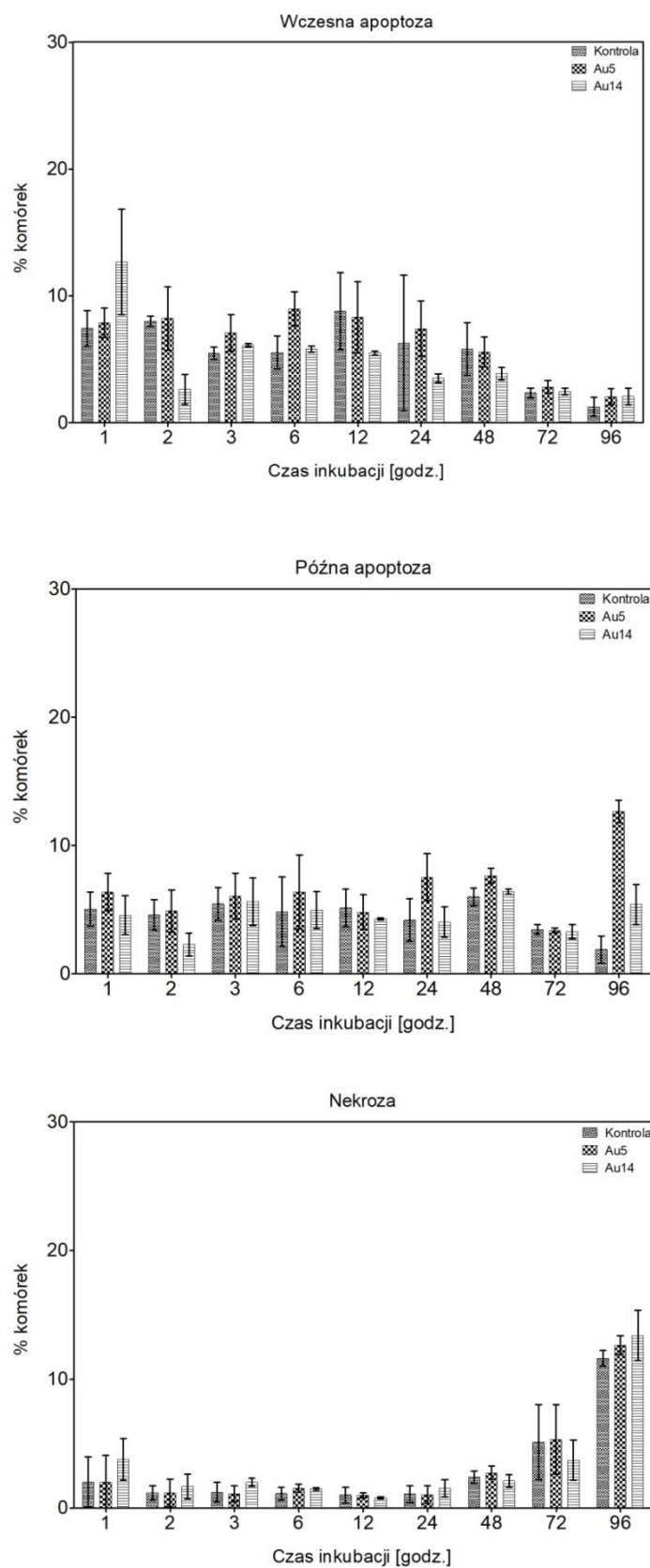
Produkcja reaktywnych form tlenu przypuszczalnie jest związana z aktywacją procesów w mitochondriach oraz uwalnianiem wolnych rodników z wnętrza mitochondriów. Podwyższony poziom RTF wskazywać może również na wczesne fazy procesu apoptozy. Natomiast spadek poziomu RTF od 12 do 96 godziny inkubacji komórek ze związkami związany jest procesami zachodzącymi w komórce, głównie zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz aktywacją ścieżek śmierci komórkowych.



Wykres 19. Poziom reaktywnych form tlenu po traktowaniu związkami Au5 lub Au14 linii komórkowej HCT116

5. Analiza apoptozy

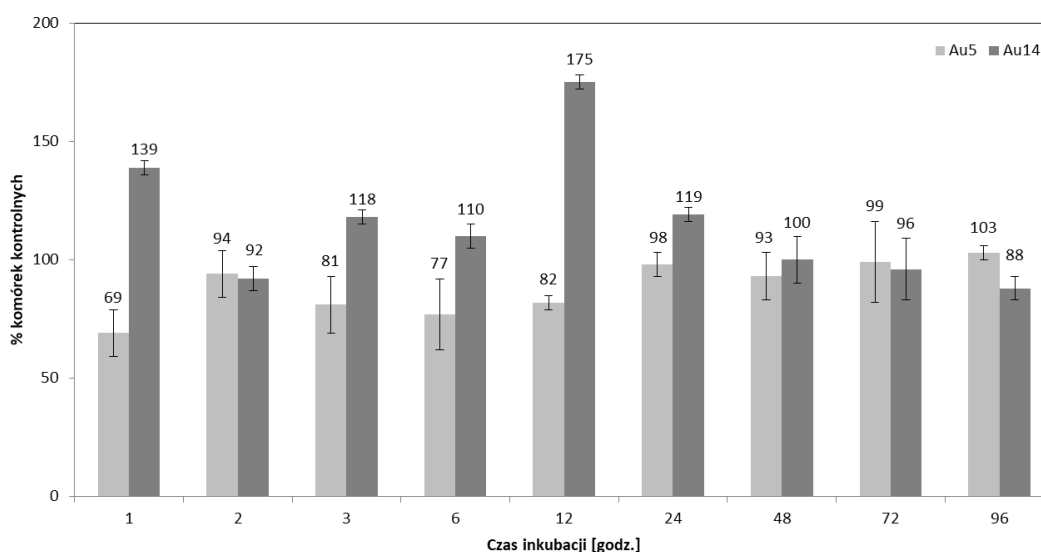
Na wykresie 20 zostały przedstawione wyniki analizy apoptozy, która została wykonana za pomocą testu z Aneksyną V. Wykres wczesnej apoptozy sugeruje, że dla związku Au14 proces ten rozpoczyna się już w 1-szej godzinie po podaniu związku, natomiast dla Au5 dopiero po 6 godzinach. Późna apoptoza najbardziej zauważalna jest dla związku Au5 po 24 godzinach traktowania tym związkiem oraz po 96 godz. Dla Au14 dopiero po 96 godz. W przypadku nekrozy można mówić o jej występowaniu dopiero po 96 godzinach inkubacji dla każdej z grup, związane to może być z zużyciem medium komórkowego i brakiem wartości odżywczych.



Wykres 20. Apoptoza w komórkach linii HCT116 nietraktowanych oraz traktowanych związkiem Au5 lub Au14

6. Analiza potencjału mitochondrialnego

Zmiany zachodzące w potencjale mitochondrialnym pokazują znaczącą różnicę pomiędzy związkami Au5 oraz Au14. Podczas gdy potencjał mitochondrialny po traktowaniu związkiem Au5 jest niższy niż w komórkach kontrolnych, kompleks Au14 zwiększa ten potencjał: 139% (1 godz.), 118% (3 godz.), 110% (6 godz.), 175% (12 godz.) oraz 119% (24 godz.), co jest widoczne na wykresie 21. Obniżony potencjał mitochondrialny w porównaniu do komórek kontrolnych świadczyć może o aktywacji apoptozy w komórkach traktowanych, natomiast podwyższony poziom sugeruje ścieżkę nekrozy [88][89]. Wyniki analizy apoptozy w połączeniu z wynikami analizy potencjału mitochondrialnego potwierdzają różnicę w mechanizmie działania kompleksów złota.

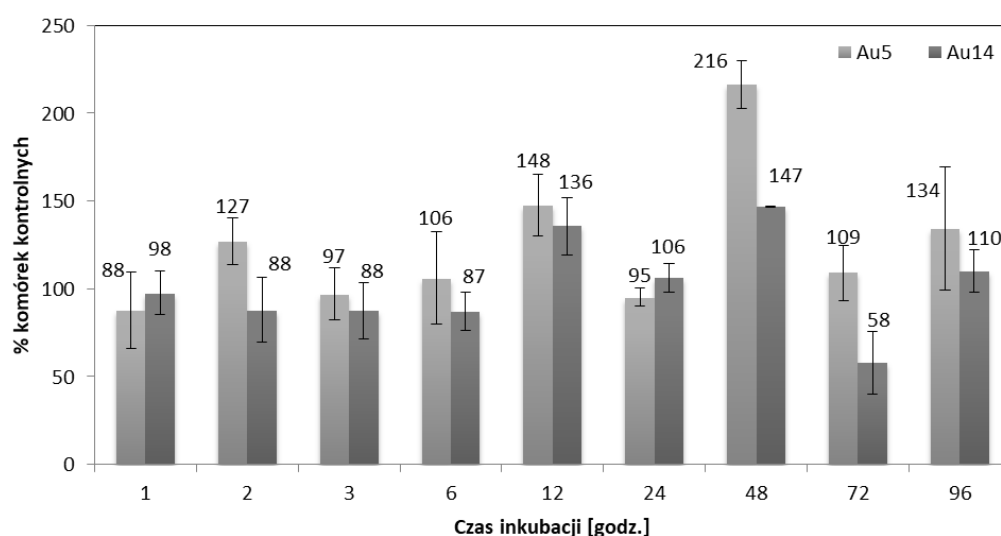


Wykres 21. Poziom potencjału mitochondrialnego w komórkach linii HCT116 po traktowaniu związkiem Au5 lub Au14

7. Analiza masy mitochondrialnej na linii komórkowej HCT116

Na rys. 15 przedstawione są wyniki analizy masy mitochondrialnej na komórkach linii HCT116 po traktowaniu kompleksami złota – Au5 lub Au14 w porównaniu do komórek nietraktowanych (kontrolnych). Brak zmian w pierwszych 6 godzinach inkubacji świadczy o braku zmian w mitochondriach.

Znaczący wzrost masy mitochondrialnej widoczny jest już po 12., 48. oraz 96. godzinach, jest to odpowiednio: 148%, 216%, 134% dla związku Au5 oraz 136%, 147% oraz 110% dla związku Au14. Biorąc pod uwagę poziomy generowania reaktywnych form tlenu (wykres 19) może sugerować to pro-oksydacyjne działanie kompleksów złota, związane bezpośrednio z aktywacją mitochondriów. Sugeruje to, że cytotoksyczność badanych kompleksów Au (III) wynika z indukcji mitochondrialnych ścieżek apoptozy [60].



Wykres 22. Poziom masy mitochondrialnej w komórkach linii HCT116 po traktowaniu związkiem Au5 lub Au14

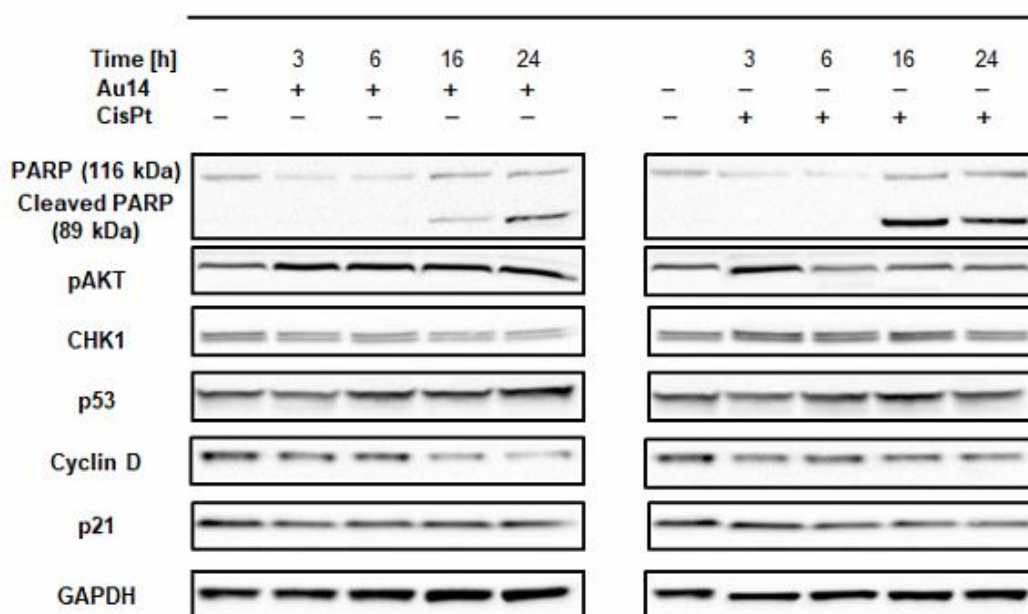
8. Analiza Western Blot

Dla potwierdzenia czy badany kompleks złota – Au14, można wykorzystać jako regulator cyklu komórkowego, przeprowadzona została dodatkowo analiza Western blot komórek cyklu komórkowego po traktowaniu związkiem Au14, w porównaniu do komórek traktowanych referencją oraz komórek kontrolnych.

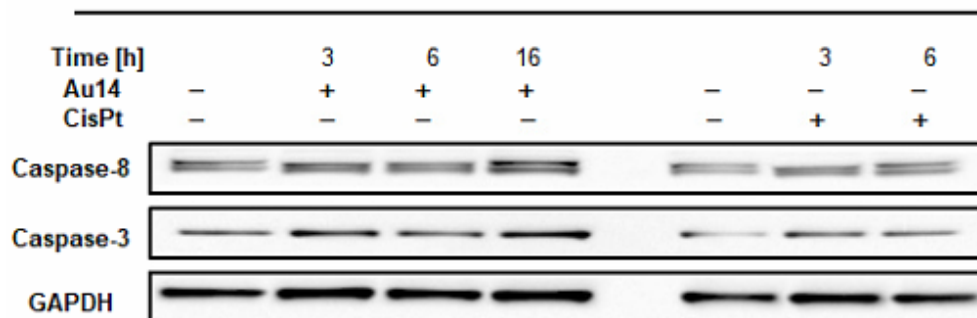
Na rysunkach 9 oraz 10 przedstawione zostały rezultaty analizy Western blot. Otrzymane wyniki potwierdzają zatrzymanie cyklu komórkowego komórek linii raka piersi MCF7 w fazie G1 oraz potwierdzają literaturowo zatrzymanie cyklu komórkowego tych samych komórek po traktowaniu cisplatyną w fazie G2

[82][90]. Cyklina D jest białkiem promującym komórki do przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego, natomiast białko p53 jest „strażnikiem genomu”, który ma za zadanie wychwycić komórki uszkodzone i skierować je na ścieżki naprawy, bądź śmierci komórkowej. W związku z tym obserwowany spadek poziomu białka – cykliny D w czasie oraz wzrost białka p53 po traktowaniu związkiem Au14 przekłada się na potwierdzenie wcześniejszych wyników, a mianowicie – zatrzymania komórek w fazie G1.

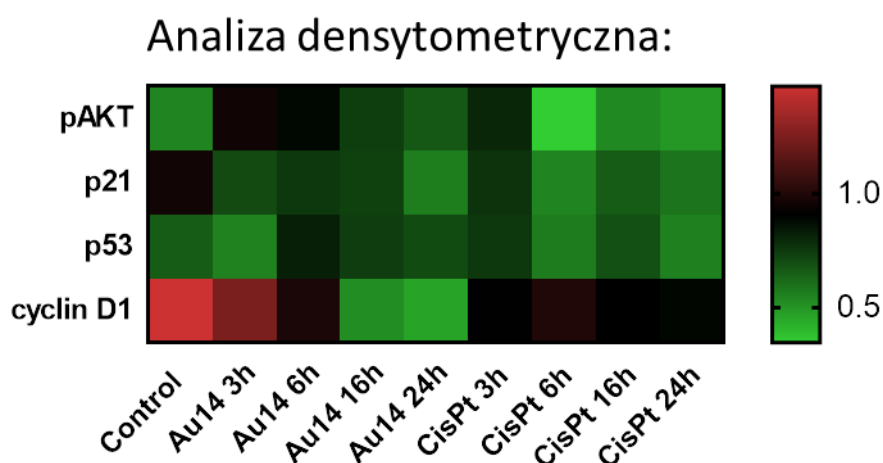
Z kolei obecność pofragmentowanego białka PARP po 16. i 24. godzinach inkubacji dla komórek traktowanych związkiem i dla komórek traktowanych referencją świadczą o aktywowaniu w tych komórkach drogi śmierci komórkowej – apoptozy. Zgodne jest to również z wynikami analizy cyklu komórkowego dla tej linii komórkowej i pochodnej Au14, gdzie już po 6. godzinach widoczne są zmiany w cyklu komórkowym – zatrzymanie w fazie G1, skąd komórka jest prowadzona na drogę apoptozy, bądź naprawy. Obecność białka PARP w 16. godzinie inkubacji świadczy o ścieżce programowanej śmierci komórkowej.



Rysunek 9. Analiza białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny



Rysunek 10. Analiza białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny



Rysunek 11. Analiza densytometryczna białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny

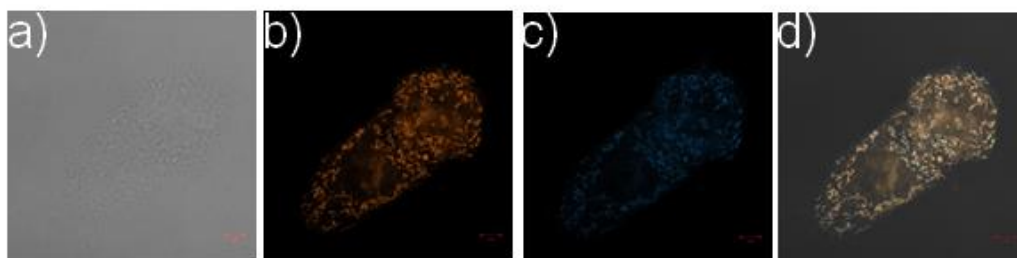
Analiza densytometryczna przedstawiona na rys. 28 pozwala na zwizualizowanie kolorymetryczne poziomów poszczególnych białek. Kolor zielony świadczy o niskiej ekspresji białka, natomiast im ciemniejszy i przechodzący w czerwień – tym wyższa ekspresja).

Z przeprowadzonej analizy Western blot wynika, że badana pochodna wpływają na aktywację białka p53 w komórkach linii MCF7, podobnie jak związek referencyjny – cisplatyna. Aktywacja białka p53 jest jedną z możliwych ścieżek indukcji ścieżki apoptozy w komórkach, w odpowiedzi na czynnik toksyczny [91][92]. Ponadto spadek ekspresji białka cyklina D oraz obecność

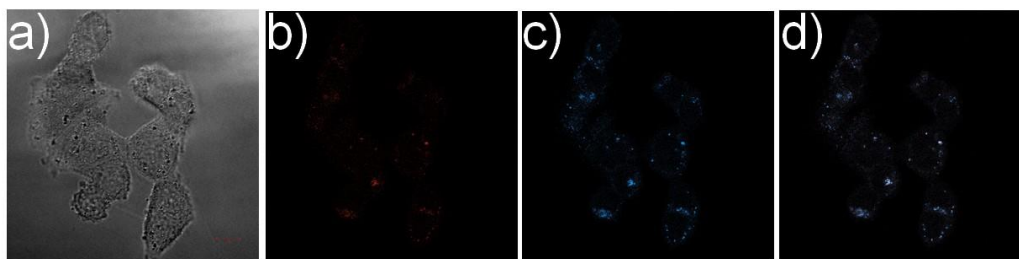
fragmentarycznego białka PARP po inkubacji z Au14 potwierdza efekt proapoptotyczny badanego kompleksu względem komórek linii MCF7 [93].

9. Określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanych związków przy pomocy mikroskopii konfokalnej

Rysunki 12 i 13 przedstawiają zdjęcia mikroskopowe komórek linii raka piersi - MCF7 w jasnym polu (rys.12a, 13a), w obecności barwnika (rys. 12b, 13b) ze związkiem Au5 (rys. 12c, 13c) oraz złożenie obydwóch obrazów (rys. 12d, 13d). Na zdjęciach widać lokalizację użytego barwnika oraz związku w komórkach. Na obrazie, który jest nałożeniem zdjęć można zauważyć, że fluorescencja występuje w tych samych miejscach obrazu, w tym samym obszarze komórkowym. Świadczy to o lokalizacji związku w komórce w miejscu, do którego specyficznie wiąże się użyty barwnik. A więc przedstawiona na poniższych fotografiach lokalizacja związku Au5 wskazuje na gromadzenie się tej substancji w mitochondriach oraz lizosomach komórek linii MCF7.

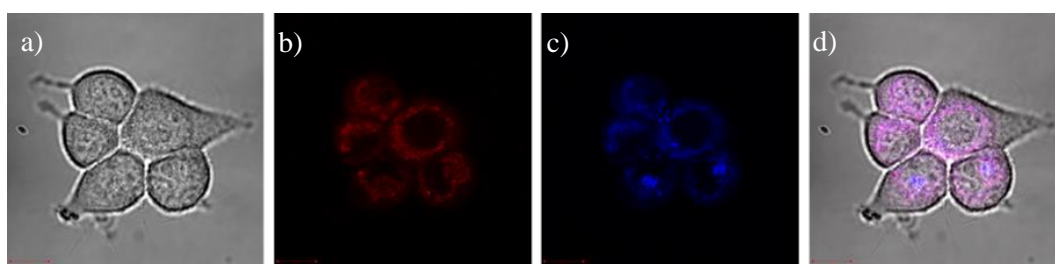


Rysunek 12. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z MitoTrackerem ORANGE, c) ze związkiem Au5, d) złożenie obrazów a), b) i c)

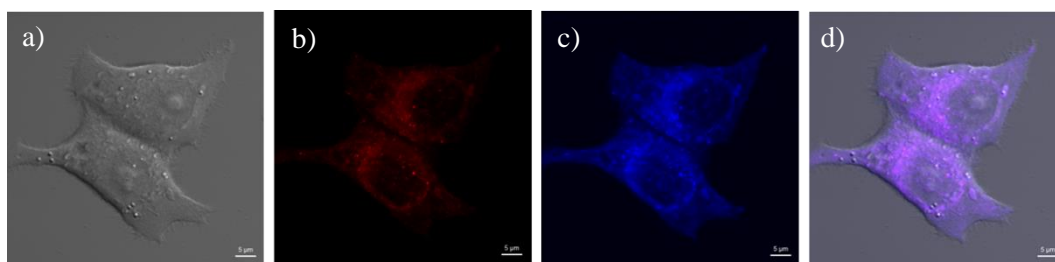


Rysunek 13. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z LysoTrackerem RED, c) ze związkiem Au5, d) złożenie obrazów b) i c)

Rysunki 14 oraz 15 przedstawiają zdjęcia mikroskopowe komórek MCF7 w jasnym polu (rys. 14a, 15a), w obecności mitotrackera RED lub lysotrackera RED (rys. 14b, 15b), ze związkami Au14 (rys. 14c, 15c) oraz złożenie obu obrazów (rys. 14d, 15d). Zdjęcia wizualizują lokalizację użytego barwnika oraz związku. Złożeniu obrazów z trzech kanałów (jasne pole, mitotracker oraz Au14) widać, że fluorescencja występuje w tych samych obszarach obrazu komórki, co świadczy o lokalizacji związku w tym samym miejscu, do którego specyficznie wiąże się barwnik. Po analizie fotografii mikroskopowych można stwierdzić, że związek Au14 lokalizuje się zarówno w mitochondriach, jak i w lizosomach komórek linii MCF7. Lokalizacja związków Au5 oraz Au14 w mitochondriach wyjaśnia mechanizmy działania, które zostały opisane wcześniej – działanie poprzez mitochondria, wytwarzanie RTF oraz kierowanie tą drogą komórek na ścieżkę apoptozy.



Rysunek 14. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z MitoTrackerem RED, c) ze związkiem Au14, d) złożenie obrazów a), b) i c)



Rysunek 15. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z LysoTrackerem RED, c) ze związkiem Au14, d) złożenie obrazów a), b) i c)

VI. Podsumowanie i wnioski

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono badania dwóch kompleksów złota (III), które zawierają pochodne 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})]\text{PF}_6)_2$ oraz $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})](\text{PF}_6)_2$.

Związki te zostały scharakteryzowane pod kątem właściwości fizykochemicznych oraz ich aktywności biologicznej. Analiza właściwości fizykochemicznych obejmowała pomiar widm absorpcyjnych oraz emisyjnych obydwu kompleksów, a także zależność widm absorpcyjnych od pH roztworu. Maksimum absorpcji dla obydwu związków występuje przy długości fali 283nm. Taką też długością fali wzbudzane były roztwory przy pomiarze fluorescencji. Związki Au5 oraz Au14 posiadają maksimum fluorescencji przy długości fali, odpowiednio: 363 nm oraz 356 nm.

Kolejnym etapem badań było poznanie aktywności biologicznej oraz mechanizmu działania pochodnych. W tym celu przeprowadzono testy cytotoksyczności na szeregu linii komórkowych, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych. Przeżywalność komórek oznaczona została dwoma różnymi testami, z których parametrem wyjściowym było poznanie wartości IC_{50} , czyli stężenia hamującego proliferację komórek w 50%. Najbardziej wrażliwymi liniami komórkowymi na działanie kompleksów złota okazały się HCT116, HCT115p53^{-/-} oraz MCF7, które na tej podstawie zostały wyselekcjonowane do dalszych badań biologicznych, mających na celu poznanie mechanizmów działania związków, będących podstawą niniejszej pracy. Badania cytotoksyczności wykazały również, że związki referencyjne użyte w pomiarach (powszechnie stosowane chemioterapeutyki) charakteryzują się niższą aktywnością w porównaniu do kompleksów złota z pochodnymi terpirydyny. W poznaniu mechanizmów działania molekularnego wykorzystana została metoda cytometrii przepływowej. Za jej pomocą przeprowadzona została analiza cyklu komórkowego na liniach najbardziej wrażliwych na działanie Au5 oraz Au14, czyli linii HCT116 oraz MCF7. Te eksperymenty wykazały, że obydwa badane związki powodują inhibicję cyklu komórkowego komórek linii HCT116 już po 12. godzinach inkubacji. Podobny efekt obserwuje się w przypadku wpływu kompleksu Au14 na cykl komórkowy komórek linii MCF7. W tym

przypadku inhibicja cyklu w fazie G1 jest zauważalna już po 6. godzinach inkubacji. Komórki linii HCT116 po traktowaniu związkami złota poddano analizie tworzenia RTF. Wyniki tej analizy wskazują na tworzenie RTF pod wpływem każdego z testowanych kompleksów po 3. oraz 6. godzinach traktowania, jednakże produkcja RTF dla Au14 jest 80÷120% wyższa niż dla Au5. Eksperyment mający na celu określenie wysokości potencjału mitochondrialnego w komórkach raka jelita grubego wskazuje na odmienny mechanizm działania obydwu związków dla tej linii komórkowej. Otrzymane rezultaty sugerują, że komórki HCT116 po traktowaniu Au5 kierowane są na apoptotyczną drogę śmierci komórkowej, z kolei po traktowaniu Au14 na drogę nekrotyczną, czyli dla kompleksu drugiego mechanizm śmierci komórkowej jest odmienny w stosunku do działania Au14 na linię komórkową MCF7. Wyniki analizy masy mitochondrialnej w powiązaniu z rezultatami produkcji RTF pokazują działanie pro-oksydacyjne kompleksów złota (III), związane z aktywacją mitochondriów.

Ponadto dla potwierdzenia wyników analizy cyklu komórkowego dla linii MCF7 i związku Au14 przeprowadzona została analiza Western blot, której wyniki wskazują na wzrost ekspresji białek odpowiedzialnych za blokadę cyklu komórkowego w fazie G1, czyli białka p53 oraz cykliny D, przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji białka p21. Ostatnim z wykonanych badań było oznaczanie lokalizacji badanych związków w komórkach przy pomocy mikroskopii konfokalnej. Zarówno związek Au5, jak i Au14 lokalizują się w mitochondriach komórek linii MCF7, związek Au14 dodatkowo jeszcze wykazuje lokalizację w lizosomach komórek raka piersi.

Podsumowując uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na wysoką aktywność antynowotworową *in vitro* badanych kompleksów złota (III) z pochodnymi 2,2'':6',2''-terpirydyny, potwierdzoną zmianami na poziomie molekularnym. Uważam, że uzyskane wyniki są obiecujące dla związków złota, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych, jednakże ich zastosowanie wymaga dalszych badań.

VII. Literatura

- [1] "Definition of cancer - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>. [Accessed: 17-Jun-2019].
- [2] "What Is Cancer? - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [3] M. R. Alison, "Introductory article," *Encycl. Life Sci.*, 2001.
- [4] A. Kumar, B. Gautam, C. Dubey, and P. K. Tripathi, "a Review: Role of Doxorubicin in Treatment of Cancer," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 5, no. 10, pp. 4117–4128, 2014.
- [5] A. C. Society, "American Cancer Society : 2019 Facts and Figures," 2019.
- [6] "Portal Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej - Serwis PTOK - Dla pacjentów - Ważne informacje - Informacje ogólne." [Online]. Available: https://ptok.pl/dla_pacjentow/wazne_informacje/informacje_ogolne. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [7] K. Janik-Papis and J. Błasiak, "Molekularne wyznaczniki raka piersi. Inicjacja i promocja - Część I," *Nowotwory*, vol. 60, no. 3, pp. 236–247, 2010.
- [8] S. Szala, "Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej," *Nowotwory. J. Oncol.*, vol. 57, no. 6, p. 633, 2007.
- [9] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [10] W. Globocan Observatory, "Principales tipos cáncer_incidencia_mortalidad_2019," vol. 876, p. 2, 2019.
- [11] International Agency for Research on Cancer, "Europe Facts - Source: Globocan," vol. 513, pp. 2018–2019, 2018.

- [12] American Cancer Association, "Estimated number of new cancer cases, all EU countries, 2018," 2018.
- [13] "Risk Factors for Cancer - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [14] M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, and S. Franceschi, "Cancer," *WHO*. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [15] D. Papamichael, "Colorectal cancer," *ESMO Handb. Cancer Sr. Patient*, pp. 109–113, 2010.
- [16] R. Partyka, I. Łobejko, A. Uttecht-Pudełko, J. Kocot, D. Kokocińska, and P. Jałowiecki, "Rak jelita grubego — główne czynniki indukujące karcynogenezę Colorectal cancer — the main factors inducing carcinogenesis," *Chir. Pol.*, pp. 85–88, 2010.
- [17] A. C. Society, "What is Colorectal cancer?," *Am. Cancer Soc.*, p. 74, 2015.
- [18] M. Panczyk and M. Mirowski, "Farmakogenetyka - znaczenie w chemioterapii raka jelita grubego," *Nowotwory. J. Oncol.*, vol. 58, no. 1, p. 62, 2008.
- [19] C. C. Surgery *et al.*, "Treating Colorectal Cancer."
- [20] P. Eroles, A. Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo, and A. Lluch, "Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways," *Cancer Treatment Reviews*. 2012.
- [21] A. C. S. 2018, "乳腺癌 (Breast Cancer)," 2018.
- [22] B. C. Basics, "About Breast Cancer Breast Cancer Basics Signs and Symptoms of Breast Cancer," *Am. Cancer Soc.*, p. 1.
- [23] J. Piekarski, "Receptory estrogenowe i progesteronowe w raku piersi - Współczesny stan wiedzy," *Współczesna Onkol.*, vol. 9, no. 9, pp. 371–379, 2005.

- [24] “Chemotherapy for Breast Cancer | American Cancer Society.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [25] “Types of Cancer Treatment | American Cancer Society.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [26] “What Is Targeted Cancer Therapy?” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy/what-is.html>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [27] “Cancer Immunotherapy.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy.html>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [28] “Radiation Therapy | American Cancer Society.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation.html>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [29] “How Is Chemotherapy Used to Treat Cancer?” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer.html>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [30] “Doxorubicin (Adriamycin) | Cancer drugs | Cancer Research UK.” [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/doxorubicin>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [31] T. Shapira, D. Pereg, and M. Lishner, “How I treat acute and chronic leukemia in pregnancy,” *Blood Rev.*, vol. 22, no. 5, pp. 247–259, 2008.
- [32] C. E. and I. A., “Use of chemotherapy during human pregnancy,” *Lancet Oncol.*, vol. 5, no. 5, pp. 283–291, 2004.
- [33] D. Agudelo, P. Bourassa, G. Bérubé, and H. A. Tajmir-Riahi, “Review on

the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 158, pp. 274–279, 2016.

- [34] J. Li *et al.*, “Reversal effects of norgestrel acetate on multidrug resistance in adriamycin-resistant MCF7 breast cancer cell line,” *Breast Cancer Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 253–263, 2001.
- [35] P. Ma and R. J. Mumper, “Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review,” *Nano Today*, vol. 8, no. 3, pp. 313–331, 2013.
- [36] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni, “Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 56, no. 2, pp. 185 LP – 229, Jun. 2004.
- [37] A. Turner *et al.*, “MADD Knock-Down Enhances Doxorubicin and TRAIL Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013.
- [38] V. Milacic, D. Fregona, and Q. P. Dou, “Gold Complexes as Prospective Metal Based Anticancer Drugs,” *Histol Histopathol*, vol. 23, pp. 101–108, 2008.
- [39] V. Amani, A. Abedi, S. Ghabeshi, H. R. Khavasi, S. M. Hosseini, and N. Safari, “Synthesis and characterization of a series of gold(III) complexes with the 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine ligand: Counterion influence on the cytotoxicity of gold(III) complexes,” *Polyhedron*, vol. 79, pp. 104–115, 2014.
- [40] K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, and C. Adin, “Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications,” *Vet. Comp. Oncol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2008.
- [41] D. Shaloam and P. B. Tchounwou, “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 740, no. 1, pp. 364–378, 2014.

- [42] I. Ott and R. Gust, "Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs," *Arch. Pharm. (Weinheim).*, vol. 340, no. 3, pp. 117–126, 2007.
- [43] M. Galanski, V. B. Arion, and M. A. J. and B. K. Keppler, "Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 9, no. 25. pp. 2078–2089, 2003.
- [44] C. X. Zhang and S. J. Lippard, "New metal complexes as potential therapeutics," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 481–489, 2003.
- [45] S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 740, pp. 364–378, 2014.
- [46] "Cisplatin | Cancer information | Cancer Research UK." [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/cisplatin>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [47] A. Casini *et al.*, "Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 102, no. 3, pp. 564–575, 2008.
- [48] B. Bertrand and A. Casini, "A golden future in medicinal inorganic chemistry: The promise of anticancer gold organometallic compounds," *Dalt. Trans.*, vol. 43, no. 11, pp. 4209–4219, 2014.
- [49] Y. Jung and S. J. Lippard, "Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 5, pp. 1387–1407, 2007.
- [50] M. A. Jakupiec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, and B. K. Keppler, "Antitumour metal compounds: More than theme and variations," *Dalt. Trans.*, no. 2, pp. 183–194, 2008.
- [51] X. Wang and Z. Guo, "Towards the rational design of platinum(II) and gold(III) complexes as antitumour agents," *Dalt. Trans.*, no. 12, pp. 1521–1532, 2008.
- [52] W. F. Kean, F. Forestier, Y. Kassam, W. W. Buchanan, and P. J. Rooney, "The history of gold therapy in rheumatoid disease," *Semin. Arthritis*

Rheum., vol. 14, no. 3, pp. 180–186, Feb. 1985.

- [53] C. F. Shaw, “Gold-Based Therapeutic Agents,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2589–2600, 1999.
- [54] F. Abbate, P. Orioli, B. Bruni, G. Marcon, and L. Messori, “Crystal structure and solution chemistry of the cytotoxic complex 1,2-dichloro(o-phenanthroline)gold(III) chloride,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 311, no. 1–2, pp. 1–5, 2000.
- [55] M. Arsenijevic *et al.*, “Cytotoxicity of gold(III) Complexes on A549 Human Lung Carcinoma Epithelial Cell Line,” *Med. Chem. (Los Angeles)*, vol. 8, no. 1, pp. 2–8, 2012.
- [56] E. R. T. Tiekink, “Gold derivatives for the treatment of cancer,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 42, no. 3, pp. 225–48, 2002.
- [57] B. Notash, V. Amani, N. Safari, S. N. Ostad, A. Abedi, and M. Z. Dehnavi, “The influence of steric effects on intramolecular secondary bonding interactions; Cytotoxicity in gold(iii) bithiazole complexes,” *Dalt. Trans.*, vol. 42, no. 19, pp. 6852–6858, 2013.
- [58] S. Carotti *et al.*, “Cytotoxicity and DNA binding properties of a chloro glycyhistidinate gold(III) complex (GHAu),” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 125, no. 1, pp. 29–38, 2000.
- [59] A. Djeković, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta, and R. Van Eldik, “Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules,” *Dalt. Trans.*, vol. 41, no. 13, pp. 3633–3641, 2012.
- [60] U. Śliwińska-Hill, J. Celmer, and L. Trynda-Lemiesz, “Związki złota jako potencjalne leki przeciwnowotworowe nowej generacji,” *Nowotwory*, vol. 63, no. 6, pp. 456–462, 2013.
- [61] C. Gabbiani, A. Casini, and L. Messori, “Gold(III) compounds as anticancer drugs,” *Gold Bull.*, vol. 40, no. 1, pp. 73–81, 2007.
- [62] C. Martín-Santos *et al.*, “Gold(III) complexes with hydroxyquinoline,

aminoquinoline and quinoline ligands: Synthesis, cytotoxicity, DNA and protein binding studies,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 153, pp. 339–345, 2015.

- [63] R. A. (Robert A. Weinberg, *The biology of cancer*. .
- [64] “Cancer and the Cell Cycle | Biology I.” [Online]. Available: <https://courses.lumenlearning.com/biology1/chapter/cancer-and-the-cell-cycle/>. [Accessed: 12-Jul-2019].
- [65] B. Podzia, G. Classroom, and F. Twi, “Regulatory cyklu komórkowego,” pp. 1–11, 2019.
- [66] B. Podzia, G. Classroom, and F. Twi, “Nowotwory i cykl komórkowy Wstęp,” pp. 1–14, 2019.
- [67] A. Stępień, M. Izdebska, and A. Grzanka, “Rodzaje śmierci komórki,” *Pomeranian J. Life Sci.*, pp. 420–428, 2007.
- [68] B. Bilińska and S. Stokłosowa, *Hodowla komórek i tkanek*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
- [69] R. Paduch, M. Klatka, and J. Klatka, “Rodzaje śmierci komórki Types of cell deth,” *Postep. Hig Med Dosw.*, vol. 61, pp. 411–418, 2015.
- [70] K. Czerwińska *et al.*, “Cytotoxic gold(III) complexes incorporating a 2,2':6',2''-terpyridine ligand framework – the impact of the substituent in the 4'-position of a terpy ring,” *Dalt. Trans.*, no. Scheme 1, pp. 3381–3392, 2017.
- [71] Katarzyna Czerwińska, “Związki koordynacyjne wybranych jonów metali przejściowych z ligandami triiminowymi – synteza, struktura, właściwości fotoluminescencyjne i magnetyczne oraz aktywność katalityczna i biologiczna,” Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- [72] G. Sittampalam *et al.*, “Assay Guidance Manual,” *Assay Guid. Man.*, no. Md, pp. 305–336, 2016.
- [73] “ZEISS Microscopy Online Campus | Interactive Tutorials.” [Online]. Available: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/index.html>.

[Accessed: 05-Aug-2019].

- [74] M. Narvekar, H. Y. Xue, J. Y. Eoh, and H. L. Wong, “Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs - Barriers of translation and solutions,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 4, pp. 822–833, 2014.
- [75] T. O. B. Olusanya, R. R. H. Ahmad, D. M. Ibegbu, J. R. Smith, and A. A. Elkordy, “Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs,” *Molecules*, vol. 23, no. 4, pp. 1–17, 2018.
- [76] T. M. Allen and F. J. Martin, “Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines,” *Semin. Oncol.*, vol. 31, no. SUPPL. 13, pp. 5–15, 2004.
- [77] P. S. Gill *et al.*, “Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi’s sarcoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 8, pp. 2353–2364, 1996.
- [78] T. Safra, “Oncologist Cardiac Safety of Liposomal Anthracyclines,” *Oncologist*, vol. 8, no. suppl 2, pp. 17–24, 2003.
- [79] I. G.-L. A. Kozik, M. Rapala-Kozik, *Analiza instrumentalna w biochemii*. UJ, 2001.
- [80] I. Gupta and M. Ravikanth, “Fluorescence properties of meso-tetrafurylporphyrins,” *J. Chem. Sci.*, vol. 117, no. 2, pp. 161–166, Mar. 2005.
- [81] T. Zerjatke *et al.*, “Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification,” *Cell Rep.*, vol. 19, no. 9, pp. 1953–1966, 2017.
- [82] M. L. Smith, “Mdm2 sensitizes MCF7 breast cancer cells to cisplatin or carboplatin,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 58, no. 2, pp. 99–105, 1999.
- [83] I. Alberts, *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*. 1999.
- [84] N. M. Fofaria, S. H. Kim, and S. K. Srivastava, “Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint

kinase-1 activation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–10, 2014.

- [85] A. Łuszczewski, E. Matyska-Piekarska, J. Trefler, I. Wawer, J. Łacki, and P. Śliwińska-Stańczyk, “Artykuł przeglądowy
Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu,” *Reumatologia/Rheumatology*, vol. 45, no. 5, pp. 284–289, 2007.
- [86] “Oxidative stress Part II. Prevention of free radical damage,” *Med. Środowiskowa*, vol. 21, no. 2, pp. 53–59, 2018.
- [87] O. Kalisz, T. Wolski, M. Gerkowicz, and M. Smorawski, “Reaktywne formy tlenu [RTF] oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób,” *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sect. DDMedicina Vet.*, vol. 62, no. 1, pp. 87–99, 2007.
- [88] N. Zamzami *et al.*, “Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death,” *J. Exp. Med.*, vol. 182, no. 2, pp. 367–377, 1995.
- [89] W. Du *et al.*, “STAT5 isoforms regulate colorectal cancer cell apoptosis via reduction of mitochondrial membrane potential and generation of reactive oxygen species,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, no. 6, pp. 2421–2429, 2012.
- [90] M. A. Shah and G. K. Schwartz, “Cell cycle-mediated drug resistance: An emerging concept in cancer therapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 8, pp. 2168–2181, 2001.
- [91] S. M. Ju, H. O. Pae, W. S. Kim, D. G. Kang, H. S. Lee, and B. H. Jeon, “Role of reactive oxygen species in p53 activation during cisplatin-induced apoptosis of rat mesangial cells,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 18, no. 8, pp. 1135–1141, 2014.
- [92] S. A. Amundson, T. G. Myers, and A. J. Fornace, “Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: Putting on the brakes after genotoxic stress,” *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3287–3299, 1998.
- [93] M. Rieber and M. S. Rieber, “Cyclin D1 overexpression induces epidermal growth factor-independent resistance to apoptosis linked to BCL-2 in human A431 carcinoma,” *Apoptosis*, vol. 11, no. 1, pp. 121–129, 2006.

VIII. Spis tabel

Tabela 1. Ilość komórek wysiewanych do testów cytotoksyczności oraz rodzaj użytego testu.....	45
Tabela 2. Przeciwciała użyte do detekcji białek w technice Western blot.....	51
Tabela 3. Cytotoksyczność badanych związków i związku referencyjnego na liniach komórkowych [test MTS] [\pm SD].....	65
Tabela 4. Cytotoksyczność badanych związków i związku referencyjnego na liniach komórkowych [test Cell-Titer Glo®] [\pm SD]	68

IX. Spis ilustracji

Rysunek 1. Statystyki zachorowań na nowotwory w 2018 roku na świecie [10]	14
Rysunek 2. Statystyki zachorowań na nowotwory w 2018 roku w Europie [11]	15
Rysunek 3. Przewidywana liczba zachorowań i śmierci z powodu nowotworów na świecie w 2018 roku [12].....	16
Rysunek 4. Czynniki zachorowania na nowotwór [14]	17
Rysunek 5. Cykl komórkowy z punktami kontrolnymi [63]	30
Rysunek 6. Szlaki apoptozy [69]	36
Rysunek 7. Wzór strukturalny kompleksu złota (III) z pochodną 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^1\text{-terpy})]\text{PF}_6)_2$ – skrót Au5 (A.) oraz jego struktura krystalograficzna (B.) [71].....	38
Rysunek 8. Wzór strukturalny kompleksu złota (III) z pochodną 2,2':6',2''-terpirydyny (terpy): $[\text{AuCl}(4'\text{-R}^2\text{-terpy})]\text{PF}_6)_2$ – skrót Au14 (A.) oraz jego struktura krystalograficzna (B.) [71]	39
Rysunek 9. Analiza białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny	78
Rysunek 10. Analiza białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny	79
Rysunek 11. Analiza densytometryczna białek cyklu komórkowego dla komórek linii MCF7 pod wpływem działania związków Au14 lub cisplatyny	79
Rysunek 12. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z MitoTrackerem ORANGE, c) ze związkiem Au5, d) złożenie obrazów a), b) i c) ...	80
Rysunek 13. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z LysoTrackerem RED, c) ze związkiem Au5, d) złożenie obrazów b) i c)	80
Rysunek 14. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z MitoTrackerem RED, c) ze związkiem Au14, d) złożenie obrazów a), b) i c).....	81
Rysunek 15. Obraz mikroskopowy komórek MCF7 a) w jasnym polu, b) z LysoTrackerem RED, c) ze związkiem Au14, d) złożenie obrazów a), b) i c)	81

X. Spis wykresów

Wykres 1. Kompleks Au5 –widma absorpcji, seria roztworów.....	54
Wykres 2. Kompleks Au14 –widma absorpcji, seria stężeń.....	55
Wykres 3. Widmo absorpcyjne związku Au5 rozpuszczonego w buforze oraz z dodatkiem Tritonu X-100	56
Wykres 4. Widmo absorpcyjne związku Au14 rozpuszczonego w buforze oraz z dodatkiem Tritonu X-100	57
Wykres 5. Au5 - zależność absorpcji od pH roztworu.....	58
Wykres 6. Au14 - zależność absorpcji od pH roztworu.....	59
Wykres 7. Au5, Au14 - widma fluorescencji przy wzbudzeniu 283nm	60
Wykres 9. Widmo ekscytacyjne oraz emisyjne dla Au5.....	61
Wykres 8. Widma absorpcyjne oraz fluorescencyjne użytego rozpuszczalnika (DMSO w PBS).....	61
Wykres 10. Widmo ekscytacyjne oraz emisyjne dla Au14.....	62
Wykres 11. Działanie związku Au5 na linie komórkowe [test MTS]	63
Wykres 12. Działanie związku Au14 na linie komórkowe [test MTS]	64
Wykres 13. Działanie związku Au ref na linie komórkowe [test MTS]	64
Wykres 14. Działanie związku Au5 na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®].....	66
Wykres 15. Działanie związku Au14 na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®].....	67
Wykres 16. Działanie cisplatyny na linie komórkowe [test Cell-Titer Glo®].....	67
Wykres 17. Cykl komórkowy po traktowaniu związkiem Au5 lub Au14 na komórkach linii HCT116.....	69
Wykres 18. Cykl komórkowy po traktowaniu związkiem Au14 lub cisplatyną na komórkach linii MCF7.....	71
Wykres 19. Poziom reaktywnych form tlenu po traktowaniu związkami Au5 lub Au14 linii komórkowej HCT116.....	74
Wykres 20. Apoptoza w komórkach linii HCT116 nietraktowanych oraz traktowanych związkiem Au5 lub Au14	75
Wykres 21. Poziom potencjału mitochondrialnego w komórkach linii HCT116 po traktowaniu związkiem Au5 lub Au14	76
Wykres 22. Poziom masy mitochondrialnej w komórkach linii HCT116 po traktowaniu związkiem Au5 lub Au14	77